



**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN MEDICINA E CHIRURGIA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIRURGICHE, ONCOLOGICHE E
GASTROENTEROLOGICHE

Direttore: Ch.mo Prof. Umberto Cillo

UOC ONCOLOGIA 2 – ISTITUTO ONCOLOGICO VENETO I.R.C.C.S.

Direttrice: Ch.ma Prof.ssa Valentina Guarneri

TESI DI LAUREA

**DETERMINANTI CLINICI E BIOLOGICI DI SENSIBILITÀ E RESISTENZA
AL TRATTAMENTO CON PARP INIBITORI
IN PAZIENTI CON CARCINOMA OVARICO**

RELATRICE: Prof.ssa Gaia Griguolo

CORRELATRICI: Dott.ssa Giulia Tasca

Dott.ssa Francesca Stella Mosimann

LAUREANDA: Emma Corò

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

INDICE

RIASSUNTO – ABSTRACT.....	pag. 7
1. INTRODUZIONE.....	pag. 13
1.1. Carcinoma ovarico: epidemiologia e fattori di rischio	
1.2. Classificazione istologica delle neoplasie epiteliali ovariche maligne	
1.3. Carcinoma ovarico con mutazioni BRCA e fenotipo BRCAness	
1.4. Stadiazione e fattori prognostici	
1.5. Trattamento e management del carcinoma ovarico alla prima diagnosi	
1.6. Trattamento del carcinoma ovarico ricorrente	
1.7. PARP inibitori: meccanismo d'azione e razionale del loro impiego nel carcinoma ovarico sieroso di alto grado	
1.8. PARP inibitori: indicazioni terapeutiche e studi registrativi	
1.9. Varianti patogenetiche di BRCA1/BRCA2: rilevanza clinica	
1.10. Saggi per la valutazione dell'HRD e biomarcatori predittivi di sensibilità ai PARPi	
1.11. PARP inibitori: meccanismi di resistenza	
2. SCOPO DELLO STUDIO.....	pag. 39
3. MATERIALI E METODI.....	pag. 41
3.1. Popolazione oggetto dello studio	
3.2. Metodologia ed analisi statistica	
4. RISULTATI.....	pag. 45
4.1. Caratteristiche della popolazione	
4.2. Distribuzione del tipo di mutazioni in BRCA1 e BRCA2	
4.3. Sopravvivenza libera da progressione e globale dall'inizio del trattamento con PARP inibitore	
4.4. Impatto delle mutazioni BRCA sulla sopravvivenza libera da progressione dall'inizio del trattamento con PARP inibitore	
4.5. Fattori prognostici clinici associati a sopravvivenza libera da progressione in corso di PARP inibitore	
4.6. Impatto del dominio di mutazione sulla sopravvivenza libera da progressione in corso di PARP inibitore	

- 4.7. Impatto del tipo di mutazione sulla sopravvivenza libera da progressione in corso di PARP inibitore
- 4.8. Impatto della presenza di mutazioni coinvolgenti l'esone 11 sulla sopravvivenza libera da progressione in corso di PARP inibitore
- 4.9. Impatto delle mutazioni BRCA sulla sopravvivenza globale dall'inizio del trattamento con PARP inibitore
- 4.10. Fattori prognostici clinici associati a sopravvivenza globale in corso di PARP inibitore
- 4.11. Impatto del dominio di mutazione sulla sopravvivenza globale in corso di PARP inibitore
- 4.12. Impatto del tipo di mutazione sulla sopravvivenza globale in corso di PARP inibitore
- 4.13. Impatto della presenza di mutazioni coinvolgenti l'esone 11 sulla sopravvivenza globale in corso di PARP inibitore

5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.....pag. 67

Bibliografia.....pag. 73

ABSTRACT

Background: Il carcinoma ovarico epiteliale rappresenta la sesta causa di morte tumore-relata nel sesso femminile in Italia. L'introduzione dei PARP inibitori nella pratica clinica ha rivoluzionato il trattamento del carcinoma ovarico in stadio avanzato e le varianti patogenetiche di BRCA rappresentano un noto biomarcatore predittivo di maggiore sensibilità a questi farmaci.

Tuttavia, lo spettro delle varianti alleliche patogenetiche dei geni BRCA1 e BRCA2 è molto ampio e la conoscenza del valore predittivo delle diverse varianti sulla risposta ai PARP inibitori rimane limitata.

Scopo dello studio: Lo scopo di questo studio retrospettivo osservazionale è caratterizzare, in una coorte *real-world*, l'effetto di diverse varianti patogenetiche di BRCA1 e BRCA2 sull'efficacia del trattamento con PARP inibitori utilizzati per il trattamento di una paziente con recidiva di carcinoma ovarico epiteliale platino-sensibile, in termini di sopravvivenza libera da progressione, e sulla prognosi delle pazienti, in termini di sopravvivenza globale.

Materiali e metodi: Lo studio ha incluso pazienti con recidiva platino-sensibile di carcinoma ovarico trattate con terapia di mantenimento con un PARP inibitore da Agosto 2015 ad Ottobre 2023 presso l'Istituto Oncologico Veneto IRCCS.

Le mutazioni patogenetiche di BRCA1 e BRCA2 sono state distinte sulla base del tipo di alterazione presente, il dominio funzionale coinvolto e l'esone coinvolto.

La sopravvivenza libera da progressione è stata calcolata come l'intervallo di tempo, misurato in mesi, intercorso fra l'inizio del trattamento con PARP inibitori e la progressione di malattia o morte per qualsiasi causa o ultimo follow-up. La sopravvivenza globale è stata calcolata come l'intervallo di tempo intercorso tra la data di inizio del trattamento con PARP inibitori e la data di morte per qualsiasi causa o ultimo follow-up. Le curve di sopravvivenza sono state stimate mediante il metodo Kaplan-Meier. Le curve di sopravvivenza di diversi sottogruppi di pazienti sono state confrontate utilizzando log-rank test.

Risultati: Lo studio ha incluso 113 pazienti trattate con PARP inibitori per recidiva di carcinoma ovarico platino-sensibile. La durata mediana del follow up dall'inizio del trattamento con PARP inibitori è stata di 56.77 mesi. La sopravvivenza libera da progressione mediana è stata di 12.42 mesi (IC 95%, 10.36-14.48). Tra i fattori clinici, sono risultati fattori prognostici per la sopravvivenza libera da progressione in corso di terapia con PARP inibitori: lo stato mutazionale dei geni BRCA1/2 ($p < 0.001$), il numero di linee di chemioterapia (2 versus 3 o più) somministrate precedentemente al PARP inibitore ($p = 0.03$), e la risposta

radiologica alla chemioterapia precedente al PARP inibitore ($p=0.01$). Abbiamo osservato un trend verso una miglior sopravvivenza libera da progressione in corso di trattamento con PARP inibitori per quelle pazienti in cui la mutazione patogenetica coinvolgeva il dominio DBD di BRCA1/2 (DBD versus RAD51-BD, RING, BRCT; $p=0.18$).

La sopravvivenza globale mediana dall'inizio della terapia con PARP inibitori è stata di 28.81 mesi (IC 95%, 23.78-33.84). Tra i fattori clinici, sono risultati fattori prognostici per la sopravvivenza globale in corso di terapia con PARP inibitori: lo stato mutazionale dei geni BRCA1/2 ($p<0.001$), il numero di linee di chemioterapia (2 versus 3 o più) somministrate precedentemente al PARP inibitore ($p=0.04$), la risposta radiologica alla chemioterapia precedente al PARP inibitore ($p<0.01$), il dominio in cui ricade la mutazione dei geni BRCA1/2, con una prognosi migliore per le pazienti per le quali la mutazione cadeva nel dominio DBD (DBD versus RAD51-BD, RING, BRCT; $p=0.02$).

Conclusioni: Concludendo, il questo studio retrospettivo monocentrico abbiamo osservato come, tra le pazienti con mutazioni patogenetiche dei geni BRCA1 e BRCA2 trattate con PARP inibitori, la localizzazione della mutazione nel dominio DBD si associ ad una miglior prognosi. Ciò potrebbe potenzialmente dipendere sia da un maggior beneficio dalla terapia con PARP inibitori che da un maggior beneficio dal trattamento successivo a base di Sali di platino e dovrebbe essere valutato in studi di maggiori dimensioni.

ABSTRACT

Background: Epithelial ovarian carcinoma represents the sixth leading cause of tumor-related death in females in Italy. The introduction of PARP inhibitors into clinical practice has revolutionized the treatment of advanced ovarian carcinoma, and pathogenic BRCA variants represent a well-known predictive biomarker of increased sensitivity to these drugs. However, the spectrum of allelic variants in the BRCA1 and BRCA2 genes is very broad, and knowledge of the predictive value of different variants on response to PARP inhibitors remains limited.

Aim: The aim of this retrospective observational study is to characterize, in a real-world cohort, the effect of different pathogenic variants of BRCA1 and BRCA2 on the efficacy of PARP inhibitor treatment, in terms of progression-free survival, and prognosis, in terms of overall survival, in patients with recurrence of platinum-sensitive epithelial ovarian carcinoma.

Methods: The study included patients with platinum-sensitive ovarian cancer recurrence treated with maintenance therapy with a PARP inhibitor from August 2015 to October 2023 at the Istituto Oncologico Veneto IRCCS.

Pathogenic BRCA1/BRCA2 mutations were classified according to the type of alteration, functional domain involved and exon involved.

Progression-free survival was calculated as the time interval, measured in months, between initiation of PARP inhibitor treatment and progression of disease or death from any cause or last follow-up. Overall survival was calculated as the time between the date of initiation of PARP inhibitor treatment and the date of death from any cause or last follow-up. Survival curves were estimated by the Kaplan-Meier method. Survival curves of different subgroups of patients were compared using log-rank test.

Results: The study included 113 patients treated with PARP inhibitors for recurrence of platinum-sensitive ovarian cancer. Median follow-up from start of PARP inhibitor was 56.77 months. The median progression-free survival was 12.42 months (95% CI, 10.36-14.48). Among clinical factors, we identified as significant prognostic factors for progression-free survival during PARP inhibitor therapy: mutational status of BRCA1/2 genes ($p < 0.001$), number of lines of chemotherapy (2 versus 3 or more) administered prior to PARP inhibitor ($p = 0.03$), radiological response to chemotherapy prior to PARP inhibitor ($p = 0.01$). We observed a trend for better progression-free survival during PARP inhibitor therapy for patients for which the pathogenic mutation involved the DBD domain as compared to other alterations (DBD versus RAD51-BD, RING, BRCT; $p = 0.18$). The median overall survival from the start of PARP inhibitor therapy was 28.81 months (95% CI, 23.78-33.84). Among

clinical factors, we identified as significant prognostic factors for overall survival during PARP inhibitor therapy: mutational status of BRCA1/2 genes ($p < 0.001$), number of lines of chemotherapy (2 versus 3 or more) administered prior to PARP inhibitor ($p = 0.04$), radiological response to chemotherapy prior to PARP inhibitor ($p < 0.01$), the domain in which the mutation of BRCA1/2 genes falls (DBD versus RAD51-BD, RING, BRCT; $p = 0.02$).

Conclusions: In conclusion, in this retrospective single-center study we observed that among patients with pathogenic mutations in the BRCA1 and BRCA2 genes, localization of the mutation in the DBD domain is associated with a better prognosis. This could potentially depend on both a greater benefit from PARP inhibitor therapy and a greater benefit from subsequent platinum salts treatment and should be confirmed in larger multicentric studies.

1. INTRODUZIONE

1.1. Carcinoma ovarico: epidemiologia e fattori di rischio

Il carcinoma dell'ovaio rappresenta una delle principali neoplasie ginecologiche nella popolazione femminile, occupando il 10° posto tra tutti i tumori femminili per prevalenza (3%) e costituendo il 30% dei tumori maligni dell'apparato genitale femminile.

Le casistiche GLOBOCAN e AIOM/AIRTUM stimano, rispettivamente, che i nuovi casi di carcinoma ovarico nel 2020 siano stati 313.959 nel mondo e 5.200 in Italia. Di conseguenza, il rischio di sviluppare tale neoplasia nell'arco della vita è di circa 1/82 per le donne italiane.

Nonostante i miglioramenti terapeutici, la prognosi di questa neoplasia resta ad oggi ancora piuttosto infausta: il tasso di sopravvivenza ad un anno è pari al 74.6%, mentre il tasso di sopravvivenza a 5 anni è pari solo al 42.7% per le pazienti che hanno avuto una diagnosi di carcinoma ovarico in Italia nel quinquennio 2005-2009 (1,2).

L'elevata mortalità associata a questa neoplasia è anche attribuibile alla sintomatologia aspecifica e tardiva e all'assenza di procedure diagnostiche con sensibilità e specificità adeguate, che non permettono quindi una diagnosi in stadio precoce. Per tali ragioni, ad oggi non disponiamo di strategie di screening adeguate per questa patologia, ed anche nelle donne portatrici di mutazioni germinali dei geni BRCA1 e BRCA2, per le quali è generalmente consigliata una sorveglianza con CA-125 ed ecografia transvaginale, i dati di efficacia a sostegno della stessa sono limitati (2).

I principali fattori di rischio correlati allo sviluppo di carcinoma ovarico possono essere distinti in: fattori legati alla storia riproduttiva (nulliparità, infertilità in assenza di anovulazione, prima gravidanza ad un'età superiore ai 35 anni), fattori legati alla ripetuta stimolazione ovarica, fattori familiari (storia familiare positiva per carcinoma ovarico) e fattori genetici (alterazioni patogenetiche dei geni BRCA1 e BRCA2) (2). Sono stati invece identificati come fattori protettivi, che si associano ad una riduzione del rischio di sviluppare carcinoma ovarico, la multiparità, l'allattamento al seno e il prolungato utilizzo di contraccettivi orali (3,4).

1.2. Classificazione istologica delle neoplasie epiteliali ovariche maligne

La maggior parte delle neoplasie maligne dell'ovaio sono di origine epiteliale. Tuttavia, anche le neoplasie epiteliali maligne dell'ovaio rappresentano una entità patologica eterogenea, come messo in evidenza da Prat et al (5) che le hanno distinte in 5 gruppi principali. Questi differiscono per caratteristiche morfologiche, immunoistochimiche e molecolari, e consistono in: carcinoma sieroso di alto grado (HGSC, 70% dei casi), carcinoma endometrioidale (EC,

10%), carcinoma a cellule chiare (CCC, 10%), carcinoma mucinoso (MC, 3%) e carcinoma sieroso di basso grado (LGSC, <5%).

Tali entità appaiono presentare anche una eziopatogenesi diversa. Si ritiene infatti che l'HGSC possa originare a partire da cellule STIC (*serous tubal intraepithelial carcinoma*), ovvero da cellule metaplasiche delle fimbrie tubariche; tuttavia, l'origine a partire dall'epitelio superficiale dell'ovaio non può essere completamente esclusa e la percentuale che si sviluppa a partire da STIC resta indeterminata.

Per le neoplasie di basso grado è meglio descritta l'evoluzione a partire da lesioni pre-neoplastiche/borderline. In particolare, è ben documentata la correlazione degli LGSCs con lo SBT (*serous borderline tumor*), tanto che si ritiene oggi che il carcinoma sieroso di basso grado rappresenti una progressione di questa lesione neoplastica dal potenziale biologico incerto.

Anche il carcinoma endometriode dell'ovaio e il carcinoma a cellule chiare sono associati alla presenza di lesioni preneoplastiche: l'endometriosi atipica è considerata il precursore di entrambe queste neoplasie. Anche nell'ambito del carcinoma mucinoso è stato descritto uno sviluppo sequenziale, con una progressione da adenoma a carcinoma passando per il tumore borderline (6,7).

È noto, inoltre, come alcune di queste istologie, nello specifico forme sierose di alto grado ed endometrioidi, possano essere diagnosticate all'interno di forme eredo-familiari, in particolare nell'ambito di sindromi HBOC (*hereditary breast-ovarian cancer*) e HNPCC (*hereditary nonpolyposis colorectal cancer*). La prima è legata alla presenza di mutazioni germinali patogenetiche in eterozigosi dei geni BRCA1 o BRCA2, implicati nell'*homologous recombination repair*; la seconda è legata alla presenza di mutazioni germinali in eterozigosi in uno dei geni coinvolti nel meccanismo di *mismatch repair*, soprattutto MSH2 (60%) e MLH1 (30%).

I diversi istotipi di carcinoma ovarico presentano inoltre un diverso profilo in termini di alterazioni molecolari in diversi geni legati allo sviluppo neoplastico: TP53 e BRCA nell'HGSC; B-RAF o K-RAS nel LGSC; K-RAS ed ERBB2 nel mucinoso; nell'istotipo endometriode si riscontrano più tipicamente mutazioni di PTEN, CTNNB1, ARID1A, PI3KCA, K-RAS; nella patogenesi del CCC sono coinvolti principalmente HNF-1 β , ARID1A, PTEN e PI3KCA.

Nello specifico, dal progetto "The Cancer Genome Atlas" (TCGA) è emerso che lo spettro mutazionale del carcinoma sieroso di alto grado è molto ristretto, comprendendo principalmente mutazioni a carico di TP53 (96% dei casi) e di BRCA1 e/o BRCA2 (22%).

BRCA1 e BRCA2 sono due geni che codificano per proteine fondamentali per la riparazione dei danni al DNA mediante il meccanismo di ricombinazione omologa, ma non sono gli unici ad intervenire in questo processo, tanto che la perdita di funzione di questa via si osserva in circa il 50% degli HGSC come conseguenza di un'inattivazione genetica o epigenetica di questi o altri geni implicati nella *pathway*.

Il fatto che i carcinomi sierosi di alto grado siano frequentemente caratterizzati da incapacità nel portare a termine una riparazione mediante *homologous recombination repair* (HRR) può spiegare l'elevata prevalenza di *somatic copy number alterations* (SCNAs) in questo tipo tumorale.

Clinicamente, il carcinoma sieroso di alto grado si caratterizza per essere diagnosticato nella maggior parte dei casi (80%) in stadio avanzato. Infatti, sebbene alla presentazione il tumore primitivo sia solitamente di piccole dimensioni, il coinvolgimento extra-ovarico è spesso già notevole e l'interessamento peritoneale estensivo. Tuttavia, si tratta anche dell'istotipo tumorale che meglio risponde alla chemioterapia, con tassi di risposta alla chemioterapia a base di Sali di platino che si aggirano attorno all'80%.

L'istotipo sieroso di basso grado si caratterizza per un tasso elevato di alterazioni della *pathway* MAPK; in particolare, mutazioni di BRAF sono presenti nel 5-30% dei casi, mentre mutazioni di KRAS sono presenti nel 35-40% dei casi (8,9); le mutazioni di ERBB2 sono invece rare (<5%), mentre si osserva più frequentemente (in circa il 20% dei casi) una sua overespressione.

Diversamente dall'HGSC, il LGSC è caratterizzato da una minor instabilità cromosomica e presenta generalmente un indice di proliferazione piuttosto basso (mediamente pari al 2.5%).

Per quanto riguarda il carcinoma mucinoso, questo si caratterizza per alterazioni di KRAS ed HER2, le quali generalmente sono mutualmente esclusive. Tuttavia, va ricordato che circa un 34% dei carcinomi mucinosi non presenta nessuna di queste due mutazioni. In questo istotipo tumorale sono frequenti anche mutazioni di TP53, riscontrate in circa il 68% dei casi. (10)

Il carcinoma endometrioidale dell'ovaio è generalmente simile alla sua controparte uterina, ma rispetto a quest'ultima presenta una frequenza simile di alterazioni della β -catenina ma un tasso inferiore di instabilità dei microsattelliti (MI) e di alterazioni del gene PTEN. D'altra parte, i carcinomi ovarici endometrioidi di alto grado possono essere difficili da distinguere morfologicamente dai carcinomi sierosi di alto grado, e spesso esprimono WT1.

L'endometriosi atipica è la lesione precursore dei carcinomi endometrioidi dell'ovaio e di quelli a cellule chiare, e una transizione diretta dall'endometriosi ovarica atipica ai carcinomi endometrioidi o a cellule chiare è stata descritta nel 15-32% dei casi. In questi casi, sono state

riscontrate alterazioni genetiche comuni nell'endometriosi adiacente, nell'endometriosi atipica e nell'adenocarcinoma, con anche evidenze, emerse da studi su modelli murini, che l'inattivazione di geni oncosoppressori come PTEN e ARID1A possa costituire un evento precoce nella trasformazione maligna dell'endometriosi. Nello specifico, attraverso tali studi è stato scoperto che la delezione di ARID1A nei modelli di laboratorio, che ne mima l'inattivazione somatica presente nelle pazienti, è insufficiente a favorire la carcinogenesi ovarica; tuttavia, la codelezione di ARID1A e PTEN determina la genesi di un carcinoma ovarico con caratteristiche endometrioidi, mentre la codelezione di ARID1A e PIK3CA porta allo sviluppo di tumori ovarici con fenotipo a cellule chiare.

Le mutazioni somatiche del gene PTEN, assieme a quelle di β -catenina (gene CTNNB1), sono le alterazioni genetiche più comunemente identificate nei carcinomi ovarici endometrioidi. Le mutazioni di CTNNB1, che si verificano nel 38-50% dei casi, sono associate a differenziazione squamosa, basso grado tumorale ed esito favorevole. Le mutazioni di PIK3CA, le quali rappresentano un meccanismo alternativo all'inattivazione del gene PTEN per l'attivazione della via di segnalazione PI3K-AKT, sono invece associate a fattori prognostici avversi. (11)

Nel carcinoma a cellule chiare le mitosi sono meno frequenti che negli altri istotipi di carcinoma ovarico (solitamente <5/10 HPFs), mentre generalmente non si riscontrano mutazioni in BRCA, instabilità cromosomica, né un cariotipo complesso.

Sono quindi altri i meccanismi molecolari coinvolti nello sviluppo del CCC, tra cui la perdita di espressione di PTEN o le sue mutazioni inattivanti, le mutazioni attivanti PIK3CA, le mutazioni di ARID1A e la perdita dell'espressione della proteina BAF250 (11). Altra peculiarità del carcinoma ovarico a cellule chiare, rispetto agli altri tipi istologici, è l'aumentata metilazione dei promotori di geni coinvolti nella pathway del recettore per gli estrogeni e la ridotta metilazione dei promotori di geni coinvolti nella pathway di HNF1.

In merito all'espressione del recettore per gli estrogeni, alcuni carcinomi ovarici presentano cellule positive a questi recettori, tuttavia tale espressione è variabile. L'*estrogen receptor* è infatti espresso da circa i 2/3 degli HGSC, dai LGSC e dai carcinomi endometrioidi, mentre la positività dei recettori ormonali non viene generalmente rilevata nei carcinomi a cellule chiare e nel carcinoma mucinoso.

1.3. Carcinoma ovarico con mutazioni di BRCA e fenotipo BRCAness

Le mutazioni dei geni oncosoppressori BRCA1 e BRCA2 sono una tra le caratteristiche più distintive dei carcinomi ovarici, in particolar modo per l'istologia HGSC.

Infatti, studi di popolazione hanno evidenziato che tra le pazienti affette da carcinoma ovarico la prevalenza di varianti patogenetiche costituzionali di BRCA è superiore al 15%, indipendentemente dall'età alla diagnosi e dalla presenza di storia familiare per tumore della mammella o dell'ovaio. La prevalenza di tali varianti patogenetiche aumenta nelle pazienti con carcinoma ovarico sieroso (17-20%).

Dall'altro lato, le donne portatrici di mutazioni germinali patogenetiche in uno degli alleli dei geni BRCA1 o BRCA2 presentano un rischio *life-time* del 16-65% di sviluppare un carcinoma ovarico, prevalentemente di istologia sierosa di alto grado, come conseguenza di un evento mutazionale che accade nell'allele sano, evento noto come *loss of heterozygosity* (LOH). (12)

Oltre alle mutazioni della linea germinale, la *pathway* di BRCA1/BRCA2 può anche essere inattivata da mutazioni somatiche, sia in BRCA1 che in BRCA2, o da una iper-metilazione del promotore di BRCA1. È stato descritto come, tra le pazienti affette da HGSC, la presenza di una mutazione patogenetica di BRCA1 e BRCA2 si associa ad una sopravvivenza migliore, mentre il silenziamento epigenetico di BRCA1 si associa ad una prognosi peggiore (5).

Il motivo per cui pazienti con carcinoma ovarico sieroso BRCA-mutato presentano una prognosi migliore di quelle con carcinoma BRCA non-mutato risiede verosimilmente nel fatto che lo stato di *homologous recombination deficiency* (HRD), che deriva dall'inattivazione dei geni BRCA, è un indicatore chiave di sensibilità alla chemioterapia a base di Sali di platino e al trattamento con inibitori della poli-ADP-ribosio polimerasi (PARP). Per questo, le pazienti BRCA-mutate presentano generalmente da un lato un'ottima risposta alla chemioterapia a base di Sali di platino, dall'altro rappresentano le candidate ideali per una terapia di mantenimento con PARP inibitori.

In aggiunta, la mutazione dei geni BRCA1 e BRCA2 è stata riconosciuta come correlata ad un fenotipo immunoreattivo di HGSC, che rispetto agli altri tre sottotipi (differenziato, proliferativo e mesenchimale) è quello che gode della sopravvivenza maggiore, associandosi ad un infiltrato linfocitario intratumorale quantitativamente superiore.

Il fatto che le mutazioni di BRCA1 e BRCA2 siano piuttosto frequenti e che le pazienti BRCA-mutate abbiano una prognosi migliore rispetto alle non mutate e maggiore sensibilità a specifici trattamenti spiega l'importanza e la necessità di effettuare la ricerca di mutazioni di questi geni in tutte le pazienti con nuova diagnosi di carcinoma ovarico HGSC, fenotipo in cui la prevalenza di mutazione dei geni BRCA1 e BRCA2 raggiunge il 20%.

Il test per l'analisi di BRCA può essere eseguito sia su sangue periferico che su tessuto tumorale, ma solo in quest'ultimo caso si è in grado di diagnosticare la presenza di mutazioni somatiche acquisite in aggiunta a quelle ereditate (germinali). In presenza di test positivo su campione tumorale va sempre eseguito il test genetico su campione di sangue, in modo da

differenziare le mutazioni germinali da quelle somatiche e inviare a counseling genetico anche i familiari delle pazienti con mutazione ereditaria (13,14).

Oltre che in neoplasie con mutazioni di BRCA1 e BRCA2 o con silenziamento epigenetico di BRCA1, difetti nella ricombinazione omologa (HRD) sono stati osservati anche in caso di perdita di funzione di altri geni coinvolti nella stessa pathway dei geni BRCA, la mutazione dei quali porta al cosiddetto fenotipo “BRCAness”. Tra questi geni ricordiamo: RAD51, ATM, ATR (*RAD3 related-protein*), PALB2, geni del Fanconi Anemia *complementation group* (FANC), EMSY, BARD e BRIP (14,15).

La presenza del fenotipo “BRCAness” identifica un sottogruppo di pazienti con elevata probabilità di risposta alla chemioterapia a base di platino e ai PARP inibitori.

Fino al 50% delle pazienti con carcinoma ovarico HGSC vengono rilevate come HRD-positive con i test attuali, terminologia che sta ad indicare un fenotipo BRCAness. In queste sono incluse il 15-20% dei casi con mutazione germinale in BRCA1 o BRCA2, le pazienti con mutazioni somatiche degli stessi geni, pazienti con silenziamento epigenetico di BRCA1 tramite ipermetilazione del suo promotore; alla restante parte dei test positivi contribuiscono il deficit di altre proteine e di altre vie coinvolte nella riparazione delle rotture del doppio filamento di DNA via ricombinazione omologa. (12)

1.4. Stadiazione e fattori prognostici

La sopravvivenza globale a 5 anni delle pazienti con tumori epiteliali maligni dell’ovaio si aggira attorno al 40-50% (12).

Il principale fattore prognostico che consente di stratificare le pazienti affette da carcinoma ovarico è la stadiazione FIGO (Federazione Internazionale dei Ginecologi e Ostetrici), ad oggi utilizzata nella sua edizione aggiornata al 2014 (15). Tale stadiazione si applica a pazienti con carcinoma ovarico, delle tube di Falloppio o del peritoneo, classificandole in 4 stadi a cui si associano prognosi nettamente diverse. In particolare, mentre la sopravvivenza a 5 anni è dell’85-90% per pazienti con diagnosi di carcinoma epiteliale ovarico in stadio I e del 57-70% in stadio II, essa cala rapidamente al 35-59% in stadio III ed a solo 17% in stadio IV.

La stadiazione FIGO, che prevede la stadiazione chirurgica della neoplasia, risulta quindi fondamentale ai fini di una corretta definizione prognostica e terapeutica della neoplasia.

In aggiunta alla stadiazione FIGO, vi sono anche altri fattori prognostici che possono essere più o meno rilevanti a seconda dello stadio di malattia: per pazienti con neoplasie in stadio

iniziale si prendono in considerazione l'età della paziente, il grado di differenziazione, ed il tipo istologico; negli stadi più avanzati, oltre all'istotipo (MC e CCC presentano ad esempio una minore chemiosensibilità), si prendono in considerazione la presenza/assenza e l'eventuale entità del residuo di malattia dopo chirurgia primaria e lo stato mutazionale dei geni BRCA1 e BRCA2.

1.5. Trattamento e management del carcinoma ovarico alla prima diagnosi

Il trattamento del carcinoma ovarico dipende dallo stadio alla diagnosi e dalle condizioni cliniche della paziente. L'obiettivo primario nel management di una paziente affetta da carcinoma ovarico è l'asportazione radicale della malattia, con residuo post-chirurgico quanto più vicino allo zero: tale obiettivo è perseguibile tramite un approccio chirurgico di *debulking* primario o tramite una chirurgia di intervallo (successiva quindi a 3 o più cicli di chemioterapia neoadiuvante, svolta allo scopo di ridurre la massa tumorale e renderla aggredibile chirurgicamente).

Oltre all'intento di essere il più possibile radicali nella resezione della malattia, la chirurgia del carcinoma ovarico ha anche lo scopo di giungere ad una corretta stadiazione chirurgica. L'approccio chirurgico più frequente è di tipo laparotomico, sebbene la tecnica laparoscopica possa talvolta trovare applicazione in mani esperte ed in casi selezionati.

La possibilità di eseguire un trattamento chirurgico può tuttavia essere limitata dalle condizioni cliniche della paziente, dato che almeno i 2/3 delle pazienti si presentano in uno stadio avanzato (FIGO III o IV) alla diagnosi. Questo può riflettersi in una compromissione del *performance status* con conseguenti limitazioni nella possibilità di trattare la paziente chirurgicamente. Tuttavia, tenuto conto che l'indicatore prognostico più importante è il volume di malattia residuo, laddove le condizioni delle pazienti lo consentano queste dovrebbero essere candidate a laparotomia primaria con isterectomia totale, salpingo-ooforectomia bilaterale, omentectomia e qualsiasi altro tentativo volto al raggiungimento di una citoriduzione ottimale, compresa la possibilità di resezione parziale o completa di organi extra-pelvici (16).

Le pazienti in stadio IIIc e IV che non risultano essere buone candidate per la chirurgia primaria dovrebbero essere sottoposte a 3 cicli di chemioterapia neoadiuvante ed a successiva rivalutazione in vista di chirurgia citoriduttrice d'intervallo, completando poi la chemioterapia dopo l'intervento (sulla scorta dei dati dei trial prospettici randomizzati EORTC e CHORUS (17,18)). Questa strategia permette di ottenere una sopravvivenza equivalente alla chirurgia di *debulking* primaria a fronte di minore morbidità. La risposta alla chemioterapia neoadiuvante può essere valutata mediante uno score istopatologico sviluppato e validato da Bohm et al (19).

Sia che si esegua un intervento di chirurgia primaria che dopo trattamento neoadiuvante, la rottura della neoplasia al momento della resezione o dell'estrazione dall'addome dovrebbe essere evitata, al fine di evitare la conseguente disseminazione di cellule tumorali.

Per le pazienti con carcinoma ovarico in stadio avanzato, la linfadenectomia non presenta un significato stadiativo, ma esclusivamente terapeutico. In questo contesto, la linfadenectomia dovrebbe essere eseguita solo limitatamente ai linfonodi con evidenza di malignità, perché il trial clinico randomizzato LION (Lymphadenectomy in Ovarian Neoplasm (20)) ha documentato che la rimozione di linfonodi clinicamente negativi durante la chirurgia citoriduttiva in pazienti con carcinoma ovarico in stadio avanzato non migliora significativamente né la sopravvivenza libera da progressione né la sopravvivenza globale, a fronte tuttavia di maggiori complicanze.

Nel trattamento del carcinoma epiteliale ovarico di nuova diagnosi, la terapia medica, in aggiunta alla chirurgia, gioca un ruolo di fondamentale importanza.

Pazienti con carcinoma ovarico in stadio iniziale (FIGO I e IIa) sono suddivise in tre categorie di rischio, in base a quelli che sono gli altri noti fattori prognostici, ognuna delle quali si associa a differenti raccomandazioni per quanto riguarda l'utilizzo della terapia medica dopo l'intervento. Pazienti definite a basso rischio (FIGO IA-IB G1) presentano un'ottima prognosi con la sola chirurgia e non sono pertanto candidate a terapia medica adiuvante; sono invece sempre candidate ad un trattamento chemioterapico adiuvante le pazienti ad alto rischio, ovvero quelle in stadio FIGO IA-IB G3, IC G2/G3 e II. Le pazienti in stadio FIGO IA-IB G2 e IC G1 sono considerate a rischio intermedio, ed in questo caso l'utilizzo di chemioterapia adiuvante può essere preso in considerazione valutando anche le altre caratteristiche della paziente e le sue preferenze.

Studi più recenti hanno inoltre mostrato come anche le caratteristiche biologiche della neoplasia ovarica siano rilevanti al fine di determinare il potenziale beneficio della terapia medica; infatti, la chemioterapia adiuvante appare di scarso beneficio nei tumori non sierosi (mucinoso, endometrioido e a cellule chiare) confinati all'ovaio, probabilmente a causa della loro limitata chemiosensibilità (21,22).

I farmaci chemioterapici utilizzati nel trattamento adiuvante (e neoadiuvante) del carcinoma ovarico sono Sali di platino (carboplatino o cisplatino), eventualmente associati ad un taxano (paclitaxel o docetaxel) (21). La combinazione carboplatino-PLD (doxorubicina peghilata liposomiale) può essere considerata una valida alternativa nelle pazienti che presentino una controindicazione alla terapia con paclitaxel, e, nelle pazienti più fragili e anziane, l'utilizzo di una schedula settimanale di somministrazione sia di carboplatino che di paclitaxel può essere considerata un'alternativa allo standard tri-settimanale.

L'utilizzo, per tali farmaci, della via di somministrazione intraperitoneale come via di somministrazione alternativa a quella endovenosa, ha dimostrato in alcuni studi di associarsi ad una migliore sopravvivenza libera da progressione e sopravvivenza globale, in pazienti selezionate con stadio FIGO III citoridotto in maniera ottimale. Tuttavia, oggi tale via di somministrazione è stata sostanzialmente abbandonata, sia a causa dei suoi maggiori effetti collaterali che ne compromettono il rapporto rischio-beneficio, i quali sono legati soprattutto alla necessità di posizionare un catetere intraperitoneale, sia perché non vi sono chiari dati a supporto di un suo beneficio nel contesto di un moderno trattamento che comprenda l'utilizzo di terapie a bersaglio molecolare come terapia di mantenimento. (12,22)

Infatti, diversi studi hanno dimostrato come l'utilizzo di un trattamento a bersaglio molecolare con PARP inibitori e/o bevacizumab, in monoterapia o in associazione sulla base delle caratteristiche della paziente, come terapia di mantenimento dopo la chemioterapia possa migliorare la prognosi di pazienti con tumore epiteliale ovarico maligno di nuova diagnosi.

Secondo le linee guida ESMO (12), la terapia di mantenimento con PARP inibitori, con o senza bevacizumab, è raccomandata per i pazienti che alla fine dei cicli di chemioterapia non abbiano evidenza di malattia residua o che abbiano dimostrato una risposta completa o parziale alla prima linea di chemioterapia a base di Sali di platino e paclitaxel.

Per le pazienti con mutazione di BRCA1 o BRCA2 si raccomanda l'utilizzo come mantenimento di olaparib per 2 anni o niraparib per 3 anni oppure olaparib e bevacizumab per 2 anni (quest'ultima opzione non rimborsata in Italia); per le pazienti BRCA-*wild type* e HRD-positive è invece indicata la somministrazione di niraparib per 3 anni oppure olaparib e bevacizumab per 2 anni. In tutti i casi le raccomandazioni si basano su evidenze di livello IA. Il bevacizumab, con livello di evidenza IA, o il niraparib, con livello di evidenza IB, possono essere raccomandati anche per il trattamento di pazienti con tumori HRD-negativi (che abbiano raggiunto una risposta completa o parziale alla chemioterapia di prima linea eseguita con platino e paclitaxel nel caso di niraparib). In queste pazienti la scelta del trattamento dovrebbe essere basata sulla malattia e sulle caratteristiche cliniche del paziente. (12)

1.6. Trattamento del carcinoma ovarico ricorrente

Nonostante i miglioramenti conseguiti nel trattamento della neoplasia epiteliale ovarica di nuova diagnosi, i tassi di recidiva nel carcinoma ovarico in stadio avanzato rimangono elevati (attorno al 75-80%), soprattutto nei primi 3 anni dal trattamento della neoplasia (12,23).

Il carcinoma ovarico epiteliale recidivato rappresenta un gruppo eterogeneo di malattie, con una marcata variabilità in termini di prognosi e di risposta ai successivi trattamenti, anche in

relazione al fatto che negli ultimi 2 anni molti nuovi farmaci sono stati anticipati al trattamento della malattia di nuova diagnosi. Come conseguenza della selezione attuata da questi farmaci sulle cellule tumorali, la popolazione di pazienti con carcinoma ovarico recidivato dopo terapia medica comprensiva di PARP inibitori presenta delle neoplasie potenzialmente più resistenti ai successivi trattamenti, soprattutto se *platinum-based*.

Per guidare la scelta del trattamento di pazienti con carcinoma ovarico recidivato, viene preso in considerazione l'intervallo libero da progressione o recidiva dall'ultimo trattamento con chemioterapia comprendente un sale di platino, il cosiddetto *platinum-free interval* (PFI), che rappresenta un surrogato clinico in grado di predire il beneficio che la paziente otterrà da un nuovo trattamento con una chemioterapia a base di Sali di platino.

La malattia di pazienti con progressione durante il trattamento o entro 4 settimane dalla sospensione della chemioterapia a base di Sali di platino è classificata come platino-refrattaria, mentre la malattia di pazienti con un PFI inferiore a 6 mesi è classificata come platino-resistente; entrambi questi gruppi di pazienti sono trattate generalmente con una chemioterapia non contenente Sali di platino. Pazienti con un PFI compreso tra i 6 e i 12 mesi presentano una malattia platino-parzialmente sensibile, mentre la piena platino sensibilità viene definita da un PFI superiore a 12 mesi; le pazienti con una malattia platino sensibile ricevono generalmente come prima scelta di trattamento per una recidiva di malattia un nuovo trattamento chemioterapico contenente Sali di platino.

Oltre al PFI, nella scelta del trattamento chemioterapico vengono presi in considerazione anche le tossicità residue, le comorbidità e l'idoneità o meno della paziente a ricevere nuovamente un platino-derivato (23,24).

Per le pazienti classificate come platino-resistenti, la polichemioterapia si è dimostrata non superiore in termini di efficacia rispetto alla monochemioterapia, a fronte di una maggiore tossicità. Pertanto, per tali pazienti il trattamento è generalmente basato su una monochemioterapia contenente un farmaco a scelta tra paclitaxel settimanale, doxorubicina liposomiale peghilata (DLP), topotecano, gemcitabina, etoposide, vinorelbina, ciclofosfamide orale (24).

Nel contesto della malattia platino resistente, nello studio di fase III AURELIA, è stato dimostrato che l'aggiunta di bevacizumab alla chemioterapia è in grado di migliorare con un vantaggio statisticamente significativo la PFS rispetto alla sola chemioterapia (25); tuttavia, tale combinazione non è ad oggi rimborsata in Italia.

Dati ancora più promettenti sono recentemente emersi dallo studio MIRASOL (26), uno studio di fase III condotto su pazienti con carcinoma ovarico platino-resistente. I risultati dello studio MIRASOL hanno permesso di concludere che il trattamento con mirvetuximab soravtansine

si associa, in pazienti con carcinoma ovarico platino-resistente la cui neoplasia presenti elevata espressione dei recettori α per il folato, ad un beneficio significativo rispetto allo *standard of care* attuale (paclitaxel o doxorubicina peghilata liposomiale o topotecano) sia in termini di sopravvivenza libera da progressione che di sopravvivenza globale. Mirvetuximab soravtansine è infatti un coniugato farmaco-anticorpo che riconosce il recettore α del folato (FR α) per rilasciare a livello tumorale DM4, una *small molecule* inibitore dei microtubuli (27). Per le pazienti non idonee a ricevere chemioterapia, soprattutto se affette da tumori ad istologia sierosa di basso grado con espressione dei recettori ormonali, la terapia ormonale con tamoxifene o inibitori dell'aromatasi può rappresentare un'opzione (28,29).

Diversamente, per le pazienti eleggibili al ritrattamento con Sali di platino, la scelta terapeutica prevede l'utilizzo di una doppietta chemioterapica contenente un sale di platino (carboplatino-paclitaxel, carboplatino-gemcitabina o carboplatino-PLD), scegliendo il secondo farmaco sulla base di tossicità residue, precedente tolleranza e preferenze della paziente.

Sono candidabili a polichemioterapia pazienti con buon *performance status* perché, sebbene superiore in efficacia rispetto al carboplatino come agente singolo, essa presenta un maggior rischio di tossicità. Pazienti con *performance status* alterato che non presentano condizioni cliniche tali da poter sostenere un trattamento combinato possono essere candidate ad una monoterapia con carboplatino o cisplatino.

Oltre alla terapia a base di Sali di platino, il trattamento delle pazienti con recidiva platino sensibile include oggi anche l'utilizzo di una terapia di mantenimento con PARP inibitori e/o bevacizumab, sulla base anche del trattamento precedentemente eseguito alla prima diagnosi. In questo contesto, i PARP inibitori possono essere utilizzati in pazienti che non li abbiano già ricevuti nel setting di prima linea e che abbiano ottenuto una risposta almeno parziale al nuovo trattamento con chemioterapia a base di Sali di platino e rappresenta l'opzione di prima scelta per pazienti già trattate con bevacizumab. È noto, inoltre, come la presenza di mutazioni in BRCA rappresenti uno dei più importanti biomarcatori di beneficio dal trattamento con PARP inibitori.

Il trattamento con bevacizumab può invece essere utilizzato in pazienti che non abbiano già ricevuto tale farmaco nel setting di prima linea e risulta un'opzione di particolare interesse per BRCA *wild type* clinicamente sintomatiche, con alto carico di malattia e/o versamento (pleurico o peritoneale), o con controindicazione al trattamento con farmaci orali. Il trattamento con bevacizumab non viene somministrato solo come mantenimento ma viene iniziato già in associazione al regime chemioterapico descritto sopra e poi proseguito come monoterapia di mantenimento fino a progressione di malattia o tossicità inaccettabile (30). Tale opzione è considerata come l'opzione di prima scelta per pazienti che presentino una recidiva dopo trattamento con PARP inibitori.

In pazienti con una recidiva platino-parzialmente sensibile di carcinoma ovarico (PFI 6-12 mesi) anche la combinazione di doxorubicina liposomiale e trabectedina può essere presa in considerazione ed è rimborsata in Italia sulla base dei risultati dello studio di fase III OVA 301 (31).

Il ruolo della chirurgia per le pazienti con una prima recidiva dopo un periodo superiore a 6 mesi dalla fine della chemioterapia di prima linea a base di platino è stato affrontato in un certo numero di studi.

In particolar modo, sulla base dell'esperienza degli studi DESKTOP I e II è stato messo a punto il punteggio AGO (*arbeitsgemeinschaft gynaekologische onkologie*) per identificare le pazienti nelle quali la resezione completa è fattibile. Un punteggio AGO positivo, definito come l'associazione di raggiungimento della resezione completa all'intervento primario (o in alternativa stadio FIGO I-II alla diagnosi), buon *performance status* e assenza di ascite, si associa infatti ad una probabilità di ottenere una resezione completa del 76%.

Successivamente, lo studio DESKTOP III (32), che ha utilizzato il punteggio AGO (positivo) per selezionare le pazienti da poter candidare ad uno studio randomizzato che ha comparato una chirurgia citoreduttiva secondaria seguita da chemioterapia *platinum-based* rispetto alla chemioterapia da sola, ha evidenziato come per le pazienti così selezionate la chirurgia citoreduttiva secondaria si associ ad un beneficio significativo in termini di OS e PFS.

Il ruolo della radioterapia nella malattia ovarica è limitato, trovando la sua principale indicazione nell'ambito della palliazione di sintomi quali dolore, sanguinamento, dispnea per impegno mediastinico. A questo scopo si dispone oggi di tecniche avanzate che sono in grado di modulare la dose a beneficio del volume target, garantendo una netta riduzione della tossicità agli organi circostanti (e.g. radioterapia stereotassica), mentre è stata abbandonata la pan-irradiazione dell'addome con dosi totali elevate (30 Gy).

1.7. PARP inibitori: meccanismo d'azione e razionale del loro impiego nel carcinoma ovarico sieroso di alto grado

I PARP inibitori sono farmaci a bersaglio molecolare che hanno rivoluzionato il trattamento delle pazienti affette da carcinoma ovarico.

Questi farmaci hanno come target l'enzima PARP (polyADP-ribosio polimerasi), che esiste nelle due isoforme PARP1 e PARP2 ed ha un ruolo fondamentale nella riparazione di rotture del DNA a singolo filamento.

Tali farmaci presentano, almeno in parte, una tossicità selettiva nei confronti di cellule tumorali con mutazioni dei geni BRCA o fenotipo BRCAness grazie al principio della letalità sintetica.

Infatti, danni al DNA si verificano continuamente in modo fisiologico e la loro presenza attiva vie di segnalazione che conducono ad una loro riparazione. Si tratta delle DDR *pathways* (DNA *damage response*), alle quali prendono parte circa 450 geni. La modalità di riparazione utilizzata per riparare il danno dipende dal tipo di danno al DNA e dal momento del ciclo cellulare in cui la cellula si trova quando il danno si verifica.

In particolare, i meccanismi di riparazione sono differenti a seconda che sia presente una *single-strand break* (SSB) o *double-strand break* (DSB); tra le due, quest'ultima è considerata la condizione più genotossica e necessita quindi di una riparazione il più fedele possibile per garantire la sopravvivenza cellulare. In caso di SSB può essere attivata la riparazione attraverso *base excision repair* (BER), attraverso *nucleotide excision repair* (NER), oppure attraverso *mismatch repair* (MMR). Nel caso di DSB, la riparazione ottimale è quella basata sul sistema della ricombinazione omologa (*homologous recombination*, HR), in quanto questo è il solo meccanismo che garantisce un elevato tasso di fedeltà nel riparare rotture a doppio filamento. Tuttavia, se la ricombinazione omologa non è possibile, la cellula procede generalmente a riparare il danno a doppio filamento mediante *non-homologous end joining* (NHEJ) o mediante *microhomology-mediated end joining* (MMEJ). Questo spiega perché le cellule tumorali che presentano compromissione dei meccanismi di HR sviluppano instabilità genomica, in quanto il danno del DNA a doppio filamento viene riparato attraverso meccanismi di correzione proni ad errore.

La perdita della capacità di riparazione via *homologous recombination* è denominata HR *deficiency* (HRD), e può derivare da mutazioni genetiche, germinali o somatiche, o da alterazioni epigenetiche interessanti uno o più geni implicati in questo processo (e.g. BRCA1/BRCA2, ma anche altri geni che partecipano alla loro stessa *pathway*).

La superfamiglia PARP è fondamentale per la riparazione delle rotture del DNA a singolo filamento tramite *base excision repair*, ed il gene la cui attività è meglio descritta è PARP1. L'enzima si lega al sito di danno al DNA, facilitando l'ADP-ribosilazione post-traduzionale attraverso l'utilizzo di NAD⁺ come substrato. In aggiunta a questo suo ruolo, sempre più si ritiene che PARP1 prenda parte anche alla delezione e riparazione di rotture a doppio filamento.

Diversi farmaci inibitori di PARP sono stati sviluppati; ad oggi tuttavia solo tre di questi sono stati approvati da FDA ed EMA per il trattamento di pazienti affette da carcinoma ovarico: olaparib, niraparib e rucaparib.

Si tratta di farmaci che agiscono sia bloccando l'attività enzimatica di PARP prevenendone quindi la auto-ADP-ribosilazione (auto-PARylation), sia impedendo la dissociazione dell'enzima dalla cromatina danneggiata, stabilizzando il complesso PARP-DNA (PARP-trapping) e portando allo stallo della forcella replicativa, con conseguente formazione di DSBs. Questo danno del DNA diventa impossibile da riparare per le cellule che presentano un deficit nell'*homologous recombination* (come nel caso di mutazioni dei geni BRCA), che di conseguenza vanno incontro a morte cellulare. Questa strategia terapeutica è definita, pertanto, "letalità sintetica". (Tabella 1)

Tabella 1. Geni di interesse per il concetto di letalità sintetica in riferimento alla funzionalità dei farmaci inibitori di PARP

Gene di interesse	Tipo di rottura	Modalità di riparazione
PARP	SSBs (<i>single strand breaks</i>)	BER (<i>base excision repair</i>)
BRCA1/2	DSBs (<i>double strand breaks</i>)	HR (<i>homologous recombination</i>)

Le mutazioni patogenetiche di BRCA sono l'esempio più classico di *homologous recombination deficiency* (HRD). Tuttavia, come già descritto, una condizione di questo tipo si presenta anche a seguito di mutazioni, genetiche o epigenetiche, in altri geni coinvolti nella stessa *pathway* dei geni BRCA, e.g. ATM, RAD50, MRE11, NSB1, PALB2, RAD51 (33–35). Conseguentemente, al fine di selezionare pazienti che possano beneficiare dell'inibizione di PARP, sono stati testati negli studi clinici molteplici saggi mirati a identificare alterazioni molecolari riconducibili ad un fenotipo HRD. Tale argomento verrà trattato nel dettaglio nel capitolo 2.0 della presente tesi.

1.8. PARP inibitori: indicazioni terapeutiche e studi registrativi

I PARP inibitori hanno dimostrato di essere efficaci come terapia di mantenimento dopo chemioterapia eseguita per una nuova diagnosi di carcinoma ovarico epiteliale o per una recidiva di malattia platino-sensibile, sempre a seguito di una risposta almeno parziale di malattia alla chemioterapia a base di Sali di platino.

L'efficacia dei PARP inibitori è stata studiata inizialmente nel setting della recidiva di malattia platino-sensibile; gli studi che hanno portato alla loro registrazione in questo setting terapeutico sono gli studi SOLO2, NOVA e ARIEL3. In questi studi è stata valutata sia la

presenza di mutazioni dei geni BRCA1/2, che la presenza di HRD valutata mediante altri test (e.g. elevato indice di instabilità genomica o BRCA LOH).

Il primo studio randomizzato di fase III ad essere condotto nel contesto della malattia recidivata è stato lo studio SOLO2 (36), un trial clinico randomizzato in doppio cieco di fase III che ha valutato l'efficacia di olaparib come monoterapia di mantenimento nelle pazienti con carcinoma ovarico platino-sensibile ricorrente che avevano precedentemente ricevuto due o più linee di chemioterapia a base di platino. In questo studio potevano essere arruolate solo pazienti con cancro ovarico epiteliale recidivato platino-sensibile con mutazioni patogenetiche di BRCA1 o BRCA2 (sia mutazioni germinali che somatiche). Tale studio ha evidenziato un vantaggio statisticamente significativo e clinicamente significativo in termini di sopravvivenza libera da progressione nelle 195 pazienti trattate con olaparib rispetto alle 99 trattate con placebo (HR 0.30, IC 95%, 0.22-0.41, $p < 0.0001$).

Lo studio NOVA (37) ha valutato l'efficacia di niraparib come monoterapia di mantenimento per le pazienti con carcinoma ovarico recidivato platino-sensibile che avessero ricevuto due o più regimi chemioterapici *platinum-based*. Si tratta di uno studio randomizzato, in doppio cieco, di fase 3, in cui le pazienti arruolate sono state classificate in base alla presenza o meno di mutazioni germinali dei geni BRCA1 e BRCA2 (gBRCA), ma veniva permesso l'arruolamento anche di pazienti i cui tumori non presentassero mutazioni BRCA1/BRCA2. Esse sono state randomizzate, in un rapporto di 2:1, a ricevere niraparib o placebo. Delle 553 pazienti arruolate, 203 sono rientrate nella coorte gBRCA (con 138 assegnate a niraparib e 65 al placebo) e 350 nella coorte non gBRCA (con 234 assegnate a niraparib e 116 al placebo). L'*endpoint* primario era la sopravvivenza libera da progressione (PFS), e questo è stato raggiunto in entrambe le coorti di pazienti. Nello specifico, nella coorte gBRCA le pazienti trattate con niraparib hanno avuto una PFS mediana di 21.0 mesi contro i 5.5 mesi del gruppo placebo (HR 0.27, IC 95%, 0.17-0.41, $p < 0.001$); nella coorte non-gBRCA le pazienti nel gruppo niraparib hanno avuto una PFS mediana di 9.3 mesi contro i 3.9 mesi del gruppo placebo (HR 0.45, IC 95%, 0.34-0.61, $p < 0.001$); nel sottogruppo di pazienti con HRD che non presentavano mutazioni *germline* di BRCA1/2, il sottogruppo di pazienti trattate con niraparib ha presentato una PFS mediana di 12.9 mesi, significativamente migliore di quella del gruppo trattato con placebo (PFS mediana 3.8 mesi; HR 0.38, IC 95%, 0.24-0.59, $p < 0.001$). In questo studio si è quindi giunti alla conclusione che, tra le pazienti con carcinoma ovarico ricorrente platino-sensibile, la durata mediana della sopravvivenza libera da progressione è stata significativamente più lunga nelle pazienti che hanno ricevuto niraparib rispetto a quelle che hanno ricevuto placebo, indipendentemente dalla presenza o assenza di mutazioni germinali in BRCA o dallo stato HRD.

Nello studio ARIEL3 è stato valutato l'utilizzo del rucaparib come terapia di mantenimento dopo una risposta alla chemioterapia a base di platino eseguita come seconda linea di trattamento o successiva in pazienti con recidiva platino-sensibile di carcinoma ovarico di alto grado. Si tratta di uno studio di fase III randomizzato, in doppio cieco, controllato con placebo, in cui erano eleggibili pazienti con un carcinoma platino-sensibile ad istologia sierosa o endometrioidale di alto grado di origine ovarica, peritoneale o dalle tube di Falloppio, e che dovevano aver precedentemente ricevuto almeno due linee di chemioterapia a base di Sali di platino, con riscontro di almeno una risposta completa o parziale. Le pazienti sono state randomizzate, con un rapporto di 2:1, a ricevere rucaparib o placebo. L'endpoint primario era la PFS valutata per tre coorti nidificate: pazienti con tumori BRCA mutati (germinali o somatiche), pazienti con tumori HRD (BRCA-mutati o BRCA wild-type con elevato score per loss of heterozygosity) e la popolazione complessiva dello studio. Delle 564 pazienti arruolate, 375 sono state trattate con rucaparib e 189 con placebo. La PFS mediana della coorte con carcinoma BRCA-mutato è stata di 16.6 mesi nel gruppo rucaparib rispetto ai 5.4 mesi nel gruppo placebo (HR 0.23, IC 95%, 0.16-0.34, $p < 0.0001$). Nella coorte con carcinoma HRD, la PFS mediana è stata di 13.6 mesi nel gruppo rucaparib rispetto ai 5.4 mesi nel gruppo placebo (HR 0.32, IC 95%, 0.24-0.42, $p < 0.0001$). Nella coorte *intention-to-treat* la PFS mediana è stata di 10.8 mesi nel gruppo rucaparib contro i 5.4 mesi nel gruppo placebo (HR 0.36, IC 95%, 0.30-0.45, $p < 0.0001$). In tutti i gruppi dello studio, rucaparib ha quindi migliorato significativamente la sopravvivenza libera da progressione delle pazienti che lo hanno ricevuto e si confermava un farmaco efficace come terapia di mantenimento nelle pazienti con carcinoma ovarico platino-sensibile dopo chemioterapia a base di Sali di platino (38).

Successivamente, i PARP inibitori sono stati testati come terapia di mantenimento anche dopo chemioterapia utilizzata nel trattamento della malattia di nuova diagnosi.

Lo studio SOLO1 (39) è un trial clinico randomizzato in doppio cieco di fase III che ha valutato l'efficacia di olaparib come terapia di mantenimento nelle pazienti con carcinoma ovarico di nuova diagnosi che avevano ricevuto un trattamento con chemioterapia a base di platino. Lo studio ha incluso pazienti con carcinomi ovarico sieroso o endometrioidale di alto grado BRCA-mutati stadio III-IV di nuova diagnosi e che avessero ricevuto una linea di trattamento con chemioterapia a base di Sali di platino con una risposta clinica completa o parziale alla terapia. Le pazienti sono state randomizzate in rapporto 2:1 a olaparib o placebo come terapia di mantenimento per un massimo di 2 anni. L'endpoint primario dello studio era la sopravvivenza libera da progressione. Le pazienti arruolate sono state 391, delle quali 260 sono state assegnate al gruppo olaparib e 131 al gruppo placebo. La sopravvivenza libera da progressione

mediana è stata 56.0 mesi nel gruppo olaparib contro i 13.8 mesi nel gruppo placebo (HR=0.33, IC 95%, 0.25-0.43, $p<0.001$). Inoltre, all'ultimo *follow-up*, le pazienti trattate con olaparib presentavano anche una sopravvivenza globale (OS) numericamente superiore a quella delle pazienti trattate con placebo, sebbene non venisse raggiunta la significatività statistica.

Lo studio PRIMA è uno studio randomizzato, in doppio cieco, di fase 3, che ha indagato l'efficacia di niraparib nelle pazienti con carcinoma ovarico di nuova diagnosi in stadio avanzato dopo una risposta alla chemioterapia di prima linea a base di Sali di platino. Pazienti con carcinoma ovarico avanzato di nuova diagnosi ad alto rischio di recidiva (stadio III con residuo di malattia post-chirurgico, trattamento neoadiuvante o inoperabili o stadio IV) sono state arruolate e randomizzate, in un rapporto 2:1, a ricevere niraparib o placebo per 3 anni dopo il completamento della chemioterapia a base di Sali di platino. L'*endpoint* primario era la PFS, valutata sia nella coorte di pazienti affette da tumori HRD che nella popolazione complessiva dello studio. Delle 733 pazienti randomizzate, 373 presentavano tumori HRD; tra le pazienti di questa coorte la PFS mediana è stata significativamente più lunga nel gruppo trattato con niraparib rispetto al gruppo placebo (21.9 mesi contro 10.4 mesi, HR 0.43, IC 95%, $p<0.001$). Nella popolazione complessiva, la PFS mediana è stata di 13.8 mesi con niraparib e 8.2 mesi con placebo (HR 0.62, IC 95%, $p<0.001$), confermando quindi la possibilità di utilizzare niraparib come terapia di mantenimento indipendentemente dallo stato HRD della neoplasia. (40)

Lo studio ATHENA-MONO (41) è uno studio internazionale randomizzato di fase III che è stato progettato per valutare in un'ampia popolazione di pazienti la terapia di mantenimento con rucaparib dopo chemioterapia di prima linea. Le pazienti per essere arruolate dovevano aver ricevuto diagnosi di carcinoma ovarico di alto grado in stadio III-IV ed essere state per questo successivamente sottoposte a citoriduzione chirurgica; dovevano inoltre aver risposto alla chemioterapia di prima linea con una doppietta a base di platino. Le pazienti sono state assegnate in modo casuale, in un rapporto di 4:1, ad assumere rucaparib ($n=427$) o placebo ($n=111$). I fattori di stratificazione erano lo stato del test HRD (tumore BRCA-mutato o BRCA wild-type con perdita di eterozigotà elevata), la malattia residua dopo la chemioterapia e il tempo trascorso dalla chirurgia. L'*endpoint* primario era la PFS, valutata sia nella coorte di pazienti affette da tumori HRD che nella popolazione *intention-to-treat* e nel sottogruppo di pazienti affette da tumori HRD-negativi. Nella coorte di pazienti affette da tumori HRD, la PFS mediana è stata significativamente più lunga nel gruppo rucaparib rispetto al gruppo placebo (28.7 mesi contro 11.3 mesi; HR=0.47, IC 95%, $p=0.0004$). Anche nella coorte *intention-to-treat* la PFS mediana è stata significativamente più lunga nel gruppo rucaparib

rispetto al gruppo placebo (20.2 mesi contro 9.2 mesi; HR=0.52, IC 95%, p=0.0001). Nella coorte di pazienti affette da tumori HRD negativi la PFS è stata numericamente superiore nel gruppo rucaparib rispetto al gruppo placebo (12.1 mesi contro 9.1 mesi). Lo studio ATHENA-MONO ha quindi dimostrato che la monoterapia con rucaparib è efficace come mantenimento dopo chemioterapia di prima linea nelle pazienti con carcinoma ovarico avanzato, conferendo un beneficio significativo rispetto al placebo sia in caso di tumore HRD-positivo che in caso di tumore HRD-negativo.

Alla luce dei risultati degli studi precedentemente descritti, olaparib è approvato e rimborsato come terapia di mantenimento esclusivamente per pazienti con carcinoma ovarico sensibile al platino con mutazione in BRCA1 o in BRCA2 (germinale o somatica), mentre niraparib e rucaparib sono stati approvati nello stesso setting indipendentemente dalla presenza di mutazioni BRCA1/BRCA2.

L'utilizzo dei PARP inibitori è stato anche testato come terapia di mantenimento dopo chemioterapia di prima linea in associazione al già consolidato mantenimento con bevacizumab. Lo studio PAOLA-1 è uno studio internazionale di fase 3, randomizzato, in doppio cieco che si poneva l'obiettivo di valutare l'effetto del mantenimento con la combinazione olaparib più bevacizumab, rispetto al solo bevacizumab. Le pazienti eleggibili presentavano un carcinoma epiteliale ovarico in stadio avanzato, di alto grado, di nuova diagnosi, e dovevano aver presentato una risposta dopo la chemioterapia di prima linea con platino-taxano più bevacizumab. Le pazienti erano eleggibili indipendentemente dall'esito chirurgico o dallo stato mutazionale di BRCA. Le pazienti sono state randomizzate, in un rapporto di 2:1, a ricevere olaparib per due anni o placebo in associazione alla terapia con bevacizumab. Delle 806 pazienti randomizzate, 537 sono state assegnate a ricevere olaparib e 269 a ricevere placebo. Dopo un *follow-up* mediano di 22.9 mesi, la PFS mediana è stata di 22.1 mesi nel gruppo olaparib più bevacizumab e di 16.6 mesi nel gruppo placebo più bevacizumab (HR=0.59, IC 95%, p<0.001). È stato inoltre osservato un beneficio statisticamente significativo in termini di PFS sia nel sottogruppo di pazienti con tumori BRCA-mutati che nelle pazienti con tumori HRD-positivi che non presentavano mutazioni BRCA, mentre non è stato osservato un beneficio significativo nel sottogruppo di pazienti con tumori senza alterazioni HRD. Sulla base di tali risultati, la combinazione di olaparib e bevacizumab può essere utilizzata come terapia di mantenimento in pazienti con carcinoma ovarico avanzato che abbiano ricevuto una terapia standard di prima linea comprendente bevacizumab, in presenza di tumori HRD-positivi, compresi quelli senza mutazione BRCA.

(42)

1.9. Varianti patogenetiche di BRCA1/BRCA2: rilevanza clinica

L'uso di inibitori della poli(ADP-ribosio) polimerasi-1 per il trattamento dei tumori HRD, inclusi quelli con mutazione di BRCA1 o BRCA2, è la prima traduzione clinica del concetto di letalità sintetica nella cura del cancro. Sebbene sviluppati per tutti i tumori con perdita di funzione dei geni BRCA, studi preclinici hanno dimostrato che mutazioni in regioni diverse dei geni BRCA hanno implicazioni diverse sia nel processo di tumorigenesi che nella sensibilità del tumore ai farmaci inibitori di PARP.

Sia BRCA1 che BRCA2 sono grandi geni caratterizzati da un esteso esone centrale, l'esone 11. Il gene BRCA1 codifica per una proteina multifunzionale che funge da ponte tra fattori responsabili della risposta ai danni del DNA e fattori che ne mediano la riparazione; il gene BRCA2 codifica invece per una proteina che svolge un ruolo centrale nella ricombinazione omologa, mediando il reclutamento della ricombinasi RAD51 nei siti di rottura a doppio filamento del DNA (DSB).

BRCA1 ha diversi domini funzionali che includono: un dominio N-terminale Really Interesting New Gene (RING) altamente conservato con un'attività ubiquitina ligasi E3, un dominio di legame al DNA (DBD), e un dominio C-terminale (BRCT) che facilita il legame delle fosfoproteine. BRCA2 ha tre domini funzionali principali: un dominio centrale denominato dominio di legame con RAD51 (RAD51-BD) che contiene otto ripetizioni BRC, le quali costituiscono il sito di interazione primario con i monomeri di RAD51, un *DNA binding domain* C-terminale altamente conservato (DBD), e un sito aggiuntivo di interazione con RAD51 (TR2).

È noto come le diverse varianti patogenetiche di BRCA1 e BRCA2 abbiano una rilevanza clinica per quanto riguarda il rischio di sviluppare una nuova neoplasia. Le donne con mutazione dei geni BRCA hanno diversa probabilità di sviluppare cancro al seno o alle ovaie a seconda di dove ricadano le mutazioni internamente a BRCA1 e BRCA2. Le donne portatrici di mutazioni patogenetiche della linea germinale localizzate nell'esone 11 di entrambi i geni corrono un rischio maggiore di sviluppare un cancro alle ovaie rispetto al seno, mentre quelle con mutazioni localizzate al 3' o 5' dei geni BRCA hanno maggiori probabilità di sviluppare un cancro al seno (43).

Ci sono anche iniziali dati che suggeriscono come la localizzazione delle mutazioni ha anche significato prognostico nelle pazienti con cancro ovarico. Uno studio retrospettivo pubblicato nel 2016 ha confrontato la sopravvivenza globale di 231 pazienti portatrici di mutazioni *frameshift* dell'esone 11 con la sopravvivenza globale di 1333 pazienti *noncarriers*, dimostrando che le donne con mutazioni in BRCA1 situate all'esterno dell'esone 11 hanno una sopravvivenza migliore rispetto alle pazienti con mutazioni situate all'interno dell'esone 11 (44); diversamente, da uno studio retrospettivo condotto su 316 pazienti di cui 78 BRCA2-mutate, è emerso che tra le pazienti con mutazione di BRCA2 quelle con localizzazione della

mutazione nel dominio RAD51-BD (che si sovrappone all'esone 11) hanno una sopravvivenza più prolungata e maggiore sensibilità al platino (45). In modelli murini con mutazione nel dominio RING del gene BRCA1 si sviluppano tumori mammari caratterizzati da una ridotta sensibilità a PARP inibitori e al platino (46,47). Per quanto riguarda BRCA2, è stato osservato in vitro che l'inattivazione del dominio DBD di BRCA2 è associata ad un'aumentata sensibilità ai PARP inibitori e al platino (48) e che invece ampie delezioni intrageniche di BRCA2, che rimuovono completamente il dominio DBD ma mantengono il dominio TR2, causano resistenza ai PARP inibitori (49).

1.10. Saggi per la valutazione dell'HRD e biomarcatori di sensibilità ai PARPi

A partire dal 2014, l'utilizzo dei PARP inibitori nella pratica clinica è stato progressivamente ampliato, portando all'esigenza di identificare quali fossero le caratteristiche associate al miglior tasso di risposta, implementando test finalizzati a identificare pazienti che potessero beneficiare di più di queste terapie di mantenimento e che permettessero potenzialmente di selezionare pazienti da candidare a tali farmaci. Sono stati quindi sviluppati molteplici saggi per tentare di valutare la presenza di HRD nelle cellule tumorali (51). Tali test possono essere suddivisi sulla base del loro meccanismo di funzionamento in:

- Test che ricercano le alterazioni genomiche che determinano HRD, ossia test che ricercano la presenza di mutazioni germinali o somatiche in geni BRCA1/2 e altri geni noti per essere implicati nella pathway dell'*homologous recombination repair*, nonché alterazioni epigenetiche di tali geni (e.g. metilazione dei promotori) che ne limitino la trascrizione;
- Test che ricercano cicatrici genomiche e *signatures* mutazionali che sono espressione dell'instabilità genomica determinata dalla HRD;
- Saggi funzionali che testano direttamente la funzionalità dei sistemi di ricombinazione omologa, come ad esempio la valutazione della formazione di foci nucleari di Rad51 a seguito dell'esposizione a fenomeni genotossici (35).

I saggi finalizzati alla valutazione delle mutazioni genetiche approvati da FDA per lo studio dei geni BRCA1 e BRCA2 sono due: Myriad Genetics' BRCAAnalysis CDx, indicato per l'identificazione di mutazioni germinali a partire da campione ematico, e FoundationFocus CDxBRCA, per la ricerca di alterazioni negli stessi geni a partire da tessuto tumorale fissato in formalina e successivamente incluso in paraffina (FFPE) (52). Anche lo stato metilativo del promotore di BRCA1 è un elemento che influenza la possibilità di risposta ai PARP inibitori; questo è un dato importante da tenere in considerazione perché si tratta di un'alterazione che generalmente si esclude mutualmente con la presenza di una mutazione inattivante BRCA1 e

perché il grado di metilazione può variare nel tempo, con possibilità di reversione da uno stato metilato ad uno non metilato e conseguente acquisizione di resistenza al farmaco inibitore di PARP. Geni non-BRCA che codificano per proteine essenziali al corretto funzionamento della riparazione del DNA mediante ricombinazione omologa sono MRE11, RAD51, ATM, CDK12, PALB2, CHEK2, RAD51C, RAD51D, BRIP1, BARD1, e altri geni coinvolti nella patogenesi dell'Anemia di Fanconi. Tra questi, tuttavia, solo due sono quelli attualmente riconosciuti come particolarmente sensibili nel riconoscere lo stato di HRD e predire la risposta clinica ai PARP inibitori, PALB2 e RAD51C/RAD51D (53–56).

Tra i test che valutano la presenza di una cicatrice genomica (*genomic scar*) relata all'HRD sono stati approvati da FDA per l'utilizzo in pratica clinica due saggi: il FoundationFocus CDxBRCA Assay e il saggio myChoice®. Il FoundationFocus CDxBRCA Assay (38) valuta la percentuale di perdita di eterozigotità (LOH, con cutoff 16%) in 22 autosomi, escludendo le regioni che coprono più del 90% dell'intero braccio cromosomico dal momento che queste generalmente originano da meccanismi diversi dall'HRD (e.g. non-disgiunzione). Il saggio MyChoice® è stato sviluppato da Myriad Genetics e utilizza uno score ottenuto dalla combinazione di LOH, squilibrio allelico dei telomeri e transizioni su larga scala. Queste alterazioni grossolane dell'assetto cromosomico riflettono il difettoso funzionamento dei meccanismi di ricombinazione omologa (57); uno score combinato ≥ 42 al myChoice® è considerato indice di HRD (58).

Su di un principio simile si basa l'analisi delle *signatures* molecolari, che hanno l'obiettivo di identificare delle caratteristiche genomiche/trascrittomiche associate ad HRD. Le più studiate sono *signatures* basate sull'analisi di DNA, e tra queste figurano HRDetect, CHORD e SigMA. Sia HRDetect che CHORD sfruttano il sequenziamento dell'intero genoma (WGS) al fine di identificare *signatures* che si associano ad HRD con elevata sensibilità (59,60). Il vantaggio di queste metodiche è che, similmente ai test basati su *genomic scars*, sono in grado di identificare gli effetti dell'HRD anche quando questa è legata a geni/meccanismi diversi da BRCA1/2, potenzialmente ampliando quindi la casistica di pazienti che potrebbero beneficiare di farmaci mirati. Tuttavia, si tratta di analisi complesse, che richiedono strumentazioni che non sono generalmente presenti nei comuni laboratori che si occupano di sequenziamento in clinica. Per ovviare a questo problema Gulhan et al hanno sviluppato uno strumento computazionale, SigMA, che attraverso l'analisi di un pannello di geni target permette di identificare fedelmente neoplasie caratterizzate dalla HRD *signature* 3 (61).

Un importante limite del *genomic scarring* come biomarker predittivo di risposta ai PARP inibitori è che si tratta di un fenomeno irreversibile, per cui non permette di identificare pazienti che hanno sviluppato resistenza attraverso mutazioni di reversione in BRCA1/2. Ne

consegue che la sua utilità clinica è maggiore nelle pazienti naïve al trattamento o platino-sensibili. Diversamente dalle *signatures* basate sul DNA, l'utilizzo di *signatures* basate sull'espressione degli RNA potrebbe permettere di definire in maniera dinamica lo stato HR in qualsiasi momento, grazie alla breve emivita e natura dinamica degli RNA. Purtroppo, ad oggi è stato condotto un solo studio in questo ambito, I-SPY 2, che ha peraltro coinvolto un basso numero di pazienti (n=115) studiate solo con analisi retrospettiva (62).

L'utilità dei test funzionali e fenotipici basati sulla ricerca di proteine sta nel fatto che la valutazione dell'espressione e localizzazione di una singola molecola permette di comprendere la funzionalità dell'intera *pathway* che sta a valle della proteina in esame. Per valutare lo stato HR risulta utile quantificare in immunistochemica la formazione di foci di Rad51 a livello nucleare a seguito dell'esposizione delle cellule a radiazioni ionizzanti o dopo aver sottoposto la paziente a terapia medica. Purtroppo, questa tipologia di saggio ha limiti significativi: sebbene i casi con bassa espressione di Rad51 siano presumibilmente HRD, non è possibile stabilire con totale certezza la funzionalità della via a monte. Inoltre, ad oggi i dati disponibili riguardanti questi test sono ancora limitati, tanto che non permettono di definire adeguatamente né quale sia il livello *cutoff* da considerare nel classificare l'entità della formazione di foci, né quale sia il momento post-trattamento più indicato per eseguire la biopsia per valutare questa caratteristica (51,63–66). Rad51 merita tuttavia di continuare ad essere considerato nel tentativo di sviluppare strumenti predittivi di risposta ai PARP inibitori, sia per il suo ruolo nella *pathway* dell'*homologous recombination repair*, sia per il fatto che prende parte alla protezione della forcella replicativa, prevenendone il collasso e la degradazione da parte di esonucleasi. In questo ambito, un altro marcatore che potrebbe avere forte valore predittivo è SLFN11, il quale può essere efficacemente rilevato con immunistochemica e la cui perdita di espressione è associata a resistenza ai PARP inibitori (67–70).

Purtroppo, l'applicabilità di questi strumenti alla pratica clinica come biomarcatori predittivi di risposta alla terapia con PARP inibitori resta ad oggi ancora limitata. Tradizionalmente era la risposta alle prime linee di trattamento a base di platino ad essere utilizzata come biomarcatore predittivo surrogato. A questo si sono aggiunti solo due tra i test sopra elencati: myChoiche® CDx per l'uso di olaparib e niraparib in HGSC, e FoundationOne CDx per l'uso di olaparib in pazienti con mCRPC (*metastatic castration-resistant prostate cancer*), essendo gli unici ad essere stati approvati da FDA come test diagnostici di accompagnamento (CDx) per la selezione del trattamento nei pazienti, oltre ovviamente al possibile utilizzo in Europa di altri test validati di simile impostazione (51).

Attualmente la valutazione su DNA tumorale circolante (cfDNA) è meno comune rispetto all'approccio basato su campione tissutale, ma potrebbe in futuro avere un ruolo importante in quanto potenzialmente in grado di fornire informazioni più complete in merito all'intero spettro mutazionale della malattia in stadio metastatico rispetto alla biopsia su un singolo sito di malattia (51).

1.11. PARP inibitori: meccanismi di resistenza

I meccanismi biologici alla base dello sviluppo di resistenza ai PARP inibitori sono stati oggetto di un certo numero di studi e ad oggi sono stati descritti diversi potenziali meccanismi che coinvolgono sia geni direttamente implicati nell'HRR sia geni che codificano per proteine che non prendono parte a questa via.

Il meccanismo più comune di resistenza acquisita ai PARP inibitori è il ripristino della funzionalità di BRCA1/2 attraverso l'acquisizione di mutazioni secondarie. Ne è un esempio la delezione c.6174delT che ripristina il quadro di lettura (ORF, *open reading frame*) di BRCA2, quindi la possibilità per la cellula di riparare DSBs via HR (49,71). In una analisi traslazionale dello studio ARIEL2 (72) sono state descritte anche mutazioni secondarie in RAD51C e RAD51D che causavano acquisizione di resistenza al rucaparib, sempre tramite riacquisizione dell'ORF. Questo tipo di mutazioni secondarie che incorrono in carcinomi ovarici BRCA1/2 mutati si associano non solo a resistenza ai PARP inibitori ma anche ai platino-derivati. Di conseguenza, ricercare con opportuni test la presenza di questo tipo di mutazioni potrebbe essere importante per selezionare poi il trattamento più indicato per le pazienti con ripresa o progressione di malattia. Al fine di agevolare le conoscenze in questo ambito Petit et al hanno recentemente pubblicato un database dove qualsiasi ricercatore può depositare le proprie scoperte su eventi di reversione in geni HR (73). Grazie a quest'opera si è arrivati a descrivere 300 mutazioni di questo tipo, principalmente delezioni che ricadono soprattutto in BRCA1 e 2.

Sebbene le mutazioni di reversione costituiscano il principale meccanismo di resistenza ai PARP inibitori, sono stati identificati anche altri meccanismi di resistenza. Tra questi, l'aumentata espressione di ABCB1, un gene che codifica per una pompa di efflusso MDR1 (media il trasporto del farmaco all'esterno della cellula); tale conoscenza potrebbe essere potenzialmente utile dal punto di vista terapeutico in quanto l'azione di questo trasportatore potrebbe essere inibita attraverso la somministrazione di inibitori di ABCB1 (verapamil, elacridar e tariquidar) (74). Ulteriori eventi mutazionali in grado di conferire resistenza alla letalità sintetica sono la perdita di espressione di PARP1, di 53BP1 e difetti nella *pathway*

NHEJ. La delezione di PARP1 non è infatti equivalente alla sua inibizione, perché il meccanismo d'azione dei PARP inibitori si basa, oltre che sull'inibizione catalitica di questo enzima, anche sull'effetto citotossico conseguente alla formazione di complessi PARP1-DNA (75,76); a riguardo ci sono addirittura evidenze che correlano positivamente il livello di espressione di PARP1 con la sensibilità del tumore ai farmaci mirati alla sua inibizione (77). Per quanto riguarda invece 53BP1 (p53-binding protein 1), si tratta di un mediatore della risposta ai danni al DNA che agisce regolando l'equilibrio tra via HR, ad alta fedeltà, e via NHEJ, maggiormente prona ad errore. La perdita di espressione di questa proteina promuove la resezione delle estremità in corrispondenza delle rotture a doppio filamento, con conseguente reclutamento di Rad51 e ripristino dell'HR anche in assenza di BRCA. Questo meccanismo riduce significativamente la risposta ai PARP inibitori tra le pazienti in cui persiste la perdita di funzione di BRCA (78–80). Effetti analoghi si hanno anche con la perdita di REV7, un effettore a valle di 53BP1 (81), o come conseguenza dell'inibizione delle protein chinasi DNA-dipendenti. Queste chinasi sono infatti enzimi cruciali per l'efficienza della NHEJ e la loro inibizione determina il recupero della funzione HR anche in linee cellulari con alterazioni di BRCA1 (82). Altro fattore critico nella NHEJ è Artemis, una proteina nucleare coinvolta nella ricombinazione VDJ e nella riparazione del DNA (ha attività endonucleasica sulle sporgenze e sulle forcine 5' e 3' quando complessata con PRKDC), la cui perdita è quindi anch'essa associata a resistenza ai PARP inibitori (83). Tutte queste evidenze derivano solo da risultati su modelli sperimentali, ma si può comunque supporre che la competenza dell'NHEJ sia una condizione necessaria all'ottenimento della letalità sintetica attraverso la combinazione di PARP inibitori e HRD (84). In aggiunta, dal momento che tutte le disregolazioni della via NHEJ si riflettono in un'overespressione di Rad51, risulta evidente il già discusso limite del saggio immunostochimico basato sulla valutazione della formazione di foci nucleari di Rad51 in questo contesto. Per concludere, anche l'aumentata attività della proteina HSP 90 è in grado di conferire resistenza ai PARP inibitori, poiché si tratta di una proteina che stabilizza il dominio C-terminale della proteina BRCA1 mutata ripristinando la competenza HR (81,85).

2. SCOPO DELLO STUDIO

L'introduzione dei PARP inibitori nella pratica clinica ha rivoluzionato il trattamento del carcinoma ovarico in stadio avanzato e le varianti patogenetiche di BRCA rappresentano un biomarcatore predittivo di maggiore sensibilità a questi farmaci.

Tuttavia, lo spettro delle varianti alleliche dei geni BRCA1 e BRCA2 è molto ampio e la conoscenza del valore predittivo delle diverse varianti sulla risposta ai PARP inibitori rimane limitata.

Inoltre, anche i tumori che presentano mutazioni di BRCA tali da associarsi ad una risposta al trattamento con un PARP inibitore possono nel tempo sviluppare resistenza a questa terapia mediante mutazioni di reversione nei geni BRCA stessi. Numerosi studi sono stati condotti sui meccanismi di resistenza ai PARP su modelli in vitro o modelli murini, ma ad oggi i dati derivanti dalla pratica clinica rimangono scarsi.

Lo scopo di questo studio è caratterizzare l'effetto di diverse varianti patogenetiche di BRCA1 e BRCA2 sull'efficacia del trattamento con PARP inibitori, in termini di sopravvivenza libera da progressione, e sulla prognosi in pazienti con recidiva di carcinoma ovarico epiteliale platino-sensibile.

3. MATERIALI E METODI

3.1. Popolazione oggetto dello studio

Questo studio osservazionale retrospettivo/prospettico monocentrico condotto presso l'Istituto Oncologico Veneto IRCCS (UOC Oncologia Medica 2) ha arruolato pazienti trattate con PARP inibitori (olaparib, rucaparib, niraparib) per una recidiva di carcinoma ovarico epiteliale platino-sensibile tra Agosto 2015 e Settembre 2023.

Le pazienti incluse nel presente studio dovevano pertanto rispettare i seguenti criteri di inclusione:

- Età \geq 18 anni;
- Diagnosi istologica di cancro ovarico epiteliale;
- Recidiva di carcinoma ovarico platino sensibile, confermata istologicamente o radiologicamente;
- Essere state trattate con PARP inibitori, secondo pratica clinica, dopo la recidiva di carcinoma ovarico;
- Aver eseguito, nell'ambito della pratica clinica, valutazione dello stato mutazionale di BRCA1/2 (somatico e/o germinale).

Le pazienti sono state retrospettivamente/prospettivamente identificate a partire dall'analisi delle cartelle cliniche.

Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico competente (Istituto Oncologico Veneto IRCCS) e le pazienti hanno fornito il loro consenso e firmato consenso informato prima dell'inclusione in studio.

3.2. Metodologia ed analisi statistica

Sono stati raccolti, a partire dalle cartelle cliniche delle pazienti incluse, i seguenti dati clinici: data di nascita, data della prima diagnosi di carcinoma ovarico, caratteristiche cliniche e istopatologiche della malattia, trattamenti ricevuti (con specifico focus sul trattamento con PARP inibitore), migliore risposta radiologica ai trattamenti, stato di vita, data di morte o data dell'ultimo follow up.

I dati anonimizzati sono stati quindi inseriti in un database dedicato.

Il database clinico è stato poi implementato con i dati biologici emersi dal sequenziamento (tramite la tecnologia di *next generation sequencing*, NGS) dei geni BRCA1 e BRCA2 condotto su campione ematico o somatico tumorale prima del trattamento a base di PARP inibitore nell'ambito della pratica clinica.

Sono state definite mutazioni patogenetiche, come da indicazioni cliniche, le mutazioni categorizzate come patogenetiche (Classe 5) o probabilmente patogenetiche (Classe 4) secondo la classificazione IARC/ACMG-AMP a 5 categorie. Tra queste rientrano mutazioni che, come conseguenza della sostituzione, delezione o inserzione di uno o più nucleotidi, portavano alla formazione di un codone di stop prematuro (mutazioni non senso, NS), allo slittamento del quadro di lettura (*frameshift*, FS), o ad anomalie nello splicing. Anche le mutazioni missenso (MS) riconosciute come patogenetiche dalla Breast Cancer Information Core committee sono state incluse, così come le mutazioni grossolane di delezione, duplicazione, triplicazione o l'inserzione di retrotrasposoni, mutazioni complessivamente note come *large rearrangements* (LR).

Oltre al tipo di mutazione presente, si è anche descritto quale fosse il dominio alterato. Per BRCA1 i domini funzionali sono stati definiti come segue: dominio RING (aminoacidi 8-96), dominio DBD (aminoacidi 452-1092), dominio BRCT (aminoacidi 1646-1736 e 1760-1855). L'esone 11 di BRCA1 corrisponde alla regione formata dagli aminoacidi 224-1366. Anche i domini funzionali di BRCA2 sono stati definiti in maniera analoga: dominio RAD51-BD (aminoacidi 900-2000), dominio DBD (aminoacidi 2459-3190). L'esone 11 di BRCA2 corrisponde alla regione coperta dagli aminoacidi 637-2281.

La sopravvivenza libera da progressione (PFS) dall'inizio del trattamento con PARP inibitori è stata definita come l'intervallo di tempo, misurato in mesi, intercorso fra l'inizio del trattamento con PARP inibitori e la progressione o morte per qualsiasi causa (qualunque avvenisse prima) o ultimo follow-up.

La sopravvivenza globale dall'inizio del PARP inibitore è stata definita come l'intervallo di tempo intercorso tra la data di inizio del trattamento con PARP inibitore e la data di morte per qualsiasi causa o ultimo follow-up.

Le curve di sopravvivenza sono state stimate mediante il metodo Kaplan-Meier. Il tempo mediano di follow-up è stato determinato attraverso il calcolo della stima inversa di Kaplan-Meier. Le curve di sopravvivenza di diversi sottogruppi di pazienti sono state confrontate utilizzando log-rank test.

Il confronto tra i gruppi è stato effettuato utilizzando il test del chi quadrato di Pearson o il test dei ranghi logaritmici (i.e. test di Mantel-Cox), a seconda della variabile analizzata.

La significatività statistica è stata definita per tutte le analisi come un valore di $p < 0.05$.

4. RISULTATI

4.1. Caratteristiche della popolazione

Il presente studio ha incluso 113 pazienti con recidiva platino sensibile di carcinoma ovarico epiteliale trattate con PARP inibitori presso l'Istituto Oncologico Veneto.

La maggior parte delle pazienti arruolate presentava carcinoma ovarico sieroso di alto grado (90.3%, n=102) ed uno stadio avanzato (FIGO III-IV) al momento della prima diagnosi di neoplasia (91.2%, n=103). L'età mediana alla prima diagnosi di carcinoma ovarico è stata 58 anni (range 37-87 anni).

Il farmaco più utilizzato nella coorte di studio è stato niraparib (60.2%, n=68), seguito da olaparib (27.4%, n=31) e da rucaparib (12.4%, n=14).

Delle 109 pazienti incluse nello studio per le quali era disponibile, da cartella clinica, l'esito del test per BRCA1/BRCA2 eseguito prima del trattamento con PARP inibitore, 38 (34.9%) sono risultate portatrici di una mutazione patogenetica del gene BRCA1 o BRCA2, di tipo germinale (n=34) o somatico (n=4).

Il trattamento con PARP inibitore è stato iniziato nel 54% delle pazienti (n=61) come mantenimento alla risposta ottenuta alla seconda linea di chemioterapia, mentre nel restante 46% (n=52) le linee di chemioterapia eseguite prima del trattamento con PARP inibitore sono state 3 o più.

Una risposta radiologica alla chemioterapia a base di platino eseguita prima dell'inizio del trattamento con PARP inibitore è stata registrata nella maggior parte delle pazienti incluse nello studio (80.5%; risposta radiologica parziale: n=77, risposta radiologica completa: n=14), mentre in un ulteriore 19.5% (n=22) è stata documentata una risposta clinica di malattia con stabilità radiologica.

Le caratteristiche demografiche e clinico-patologiche della coorte di pazienti incluse nel presente studio sono state riassunte nella Tabella 2.

Tabella 2. Caratteristiche demografiche e clinico-patologiche delle pazienti

Istologia, n (%)	
Serosa	102 (90.3%)
Endometrioide	9 (8.0%)
Indifferenziata	2 (1.8%)
A cellule chiare	0
Stadio FIGO alla diagnosi, n (%)	
I/II	10 (8.8%)
III	76 (67.3%)
IV	27 (23.9%)
Chirurgia, n (%)	
Non eseguita	1 (0.9%)
Primaria	74 (65.5%)
D'intervallo	37 (32.7%)
Non noto	1 (0.9%)
Malattia residua, n (%)	
No	39 (34.5%)
Sì	35 (31.0%)
Non noto	39 (34.5%)
Numero di line di chemioterapia pre-PARPi, n (%)	
2	61 (54.0%)
3 o +	52 (46.0%)
Risposta dopo chirurgia/chemioterapia, n (%)	
Risposta completa	14 (12.4%)
Risposta parziale	77 (68.1%)
Stabilità di malattia	22 (19.5%)
PARP inibitore somministrato, n (%)	
Niraparib	68 (60.2%)
Olaparib	31 (27.4%)
Rucaparib	14 (12.4%)
Mutazione patogenetica in BRCA 1 o 2, n (%)	
No	75 (66.4%)
Sì	38 (33.6%)
Gene mutato, n (%)	
BRCA1	22 (19.5%)
BRCA2	16 (14.2%)
Tot.	38 (33.7%)
Mutazioni, n (%)	
Germline	34 (30.1%)
BRCA1	19
BRCA2	15
Somatiche	4 (3.5%)
BRCA1	3
BRCA2	1

Localizzazione della mutazione, n (%)	
BRCA1	
DBD	7 (31.8%)
RING	1 (4.6%)
BRCT	7 (31.8%)
Altre localizzazioni	7 (31.8%)
BRCA2	
DBD	4 (25%)
RAD51-BD	6 (37.5%)
Altre localizzazioni	6 (37.5%)
Esone 11	
No	16
Sì	22 (57.9%)

DBD, DNA Binding Domain; RING, Really Interesting New Gene; BRCT, C-terminal domain di BRCA1; RAD51-BD, Rad51-Binding Domain.

4.2. Distribuzione del tipo di mutazioni in BRCA1 e BRCA2

Come detto, 38 delle 113 pazienti sono risultate portatrici di mutazioni patogenetiche nei geni BRCA1 o BRCA2 (33.6%) (Figura 1). Il 57.9% delle mutazioni patogenetiche ricadeva in BRCA1, il 42.1% in BRCA2. La maggior parte delle mutazioni in entrambi i geni era di tipo germinale (89.5%, n=34), mentre 4 erano di tipo somatico (va tuttavia specificato che la maggior parte dei test eseguiti erano di tipo germinale) (Figura 2).

Per quanto riguarda la regione del gene coinvolta dalla mutazione, il dominio funzionale più frequentemente colpito differisce tra BRCA1 e BRCA2. In BRCA1 il dominio mutato nel maggior numero di pazienti è stato DBD (31.8%, n=7). In BRCA2 è stato RAD51-BD (37.5%, n=6).

Le mutazioni ricadevano in più del 50% dei casi nell'esone 11 (55.3%, n=21), sia di BRCA1 (n=11) che di BRCA2 (n=10). (Figura 2)

Figura 1. Percentuale di pazienti incluse nello studio con mutazione patogenetica dei geni BRCA1 o BRCA2.

MUTAZIONE PATOGENETICA IN BRCA1/2

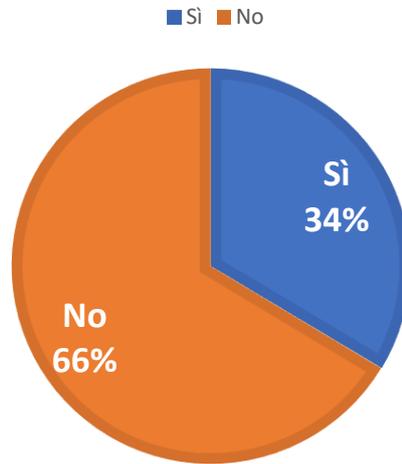
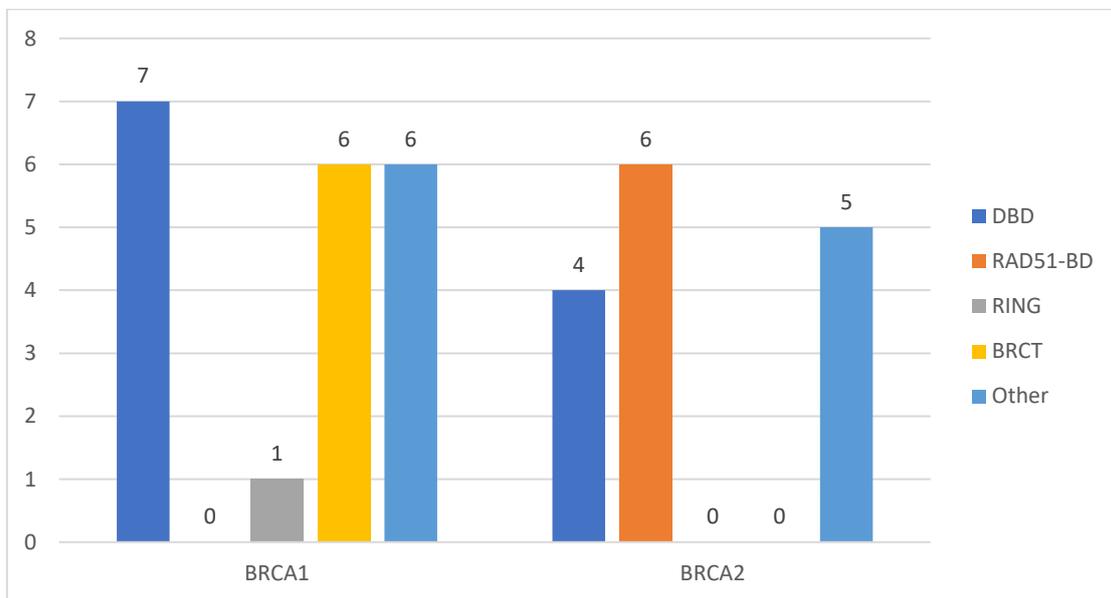


Figura 2. Distribuzione dei domini in cui ricadono le mutazioni di BRCA1 e BRCA2.

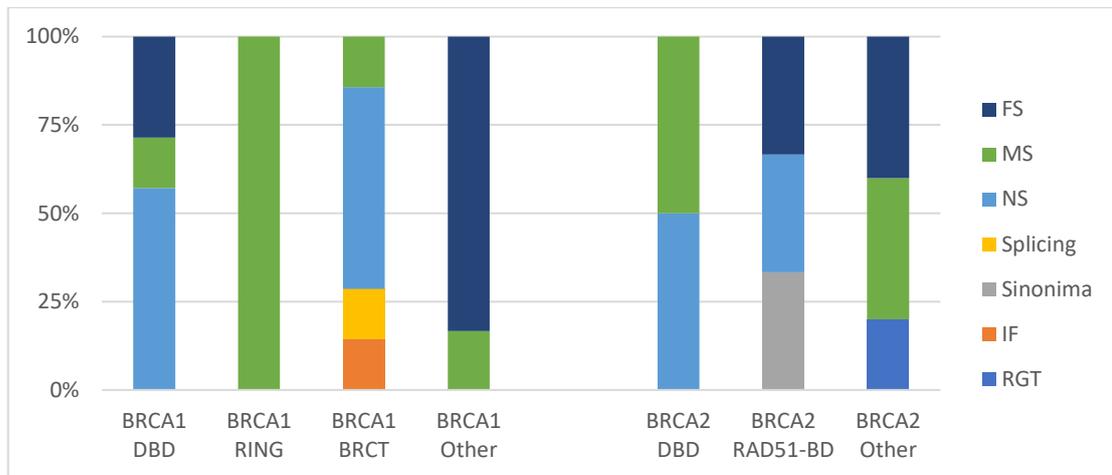


Abbiamo poi valutato il tipo di mutazione riscontrata, sia per BRCA1 che per BRCA2.

In BRCA1 il 36.4% sono state mutazioni *frameshift* (n=8), un ulteriore 36.4% mutazioni non senso (n=8), il 4.5% mutazioni missenso (n=1), il 4.5% mutazioni in frame (n=1), il 4.5% mutazioni di splicing (n=1).

In BRCA2 il 37.5% sono state mutazioni non senso (n=6), il 31.3% mutazioni *frameshift* (n=5), il 6.3% mutazioni missenso (n=1), il 6.3% mutazioni conseguenti a riarrangiamento genico (n=1). (Figura 3)

Figura 3. Distribuzione dei *coding effect* delle mutazioni presenti in BRCA1 e BRCA2.



FS, mutazione *frameshift*; MS, mutazione missenso; NS, mutazione non senso; Splicing, mutazione di splicing; Sinonima, mutazione sinonima; IF, mutazione *in frame*; RGT, riarrangiamento genico.

4.3. Sopravvivenza libera da progressione e globale dall'inizio del trattamento con PARP inibitore

Il follow up mediano dall'inizio del trattamento con PARP inibitore è stato di 56.77 mesi (IC 95%, 43.19-70.36).

La PFS mediana, calcolata a partire dall'inizio del trattamento con PARP inibitore, è stata di 12.42 mesi (IC 95%, 10.36-14.48). (Figura 4)

L'OS mediana, calcolata a partire dall'inizio del trattamento con PARP inibitore, è stata di 28.81 mesi (IC 95%, 23.78-33.84). (Figura 5)

Figura 4. Curva di Kaplan Meier per sopravvivenza libera da progressione dall'inizio del trattamento con PARP inibitore.

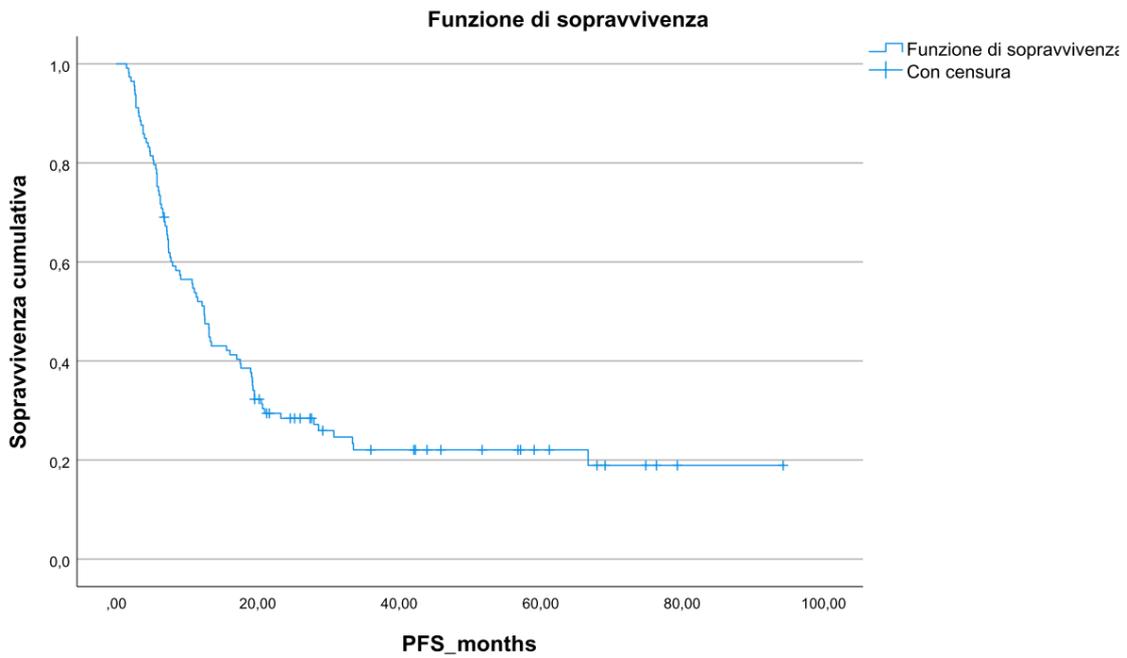
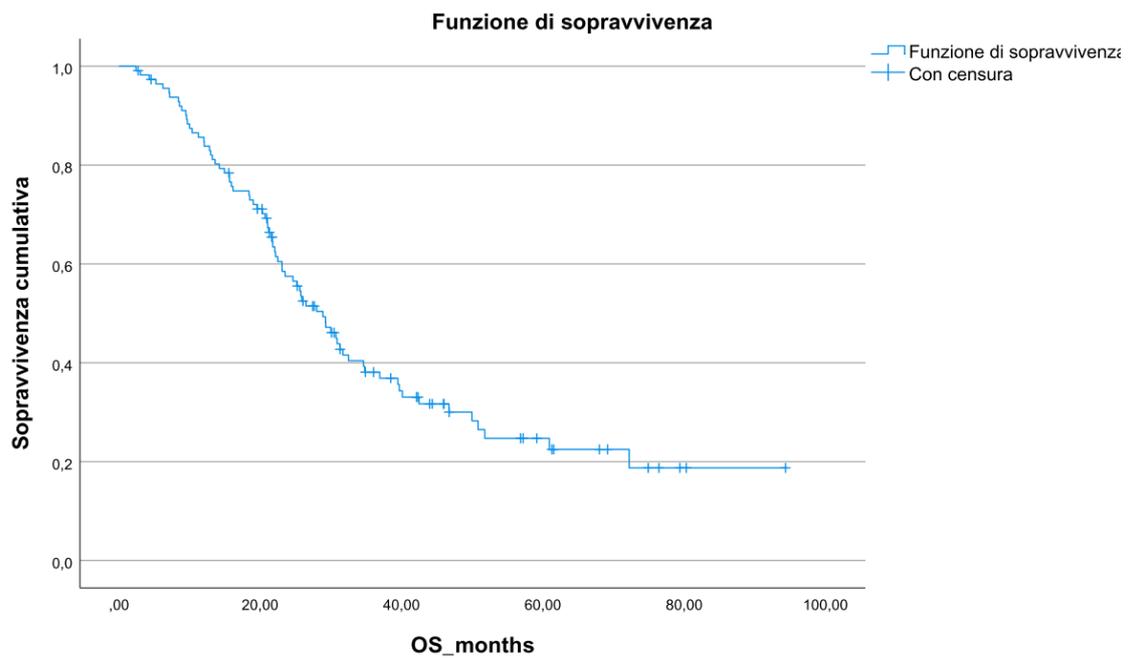


Figura 5. Curva di Kaplan Meier per sopravvivenza globale dall'inizio del trattamento con PARP inibitore.



4.4. Impatto delle mutazioni BRCA sulla sopravvivenza libera da progressione dall'inizio del trattamento con PARP inibitore

In linea con il meccanismo di funzionamento dei farmaci inibitori di PARP, le pazienti con mutazioni patogenetiche dei geni BRCA1 e BRCA2 hanno mostrato una PFS significativamente più prolungata in corso di trattamento con PARP inibitori rispetto alle pazienti senza mutazioni BRCA ($p < 0.001$). Per le pazienti con neoplasie BRCA-mutate, la PFS mediana, calcolata a partire dall'inizio della somministrazione del PARP inibitore, è stata di 19.32 mesi (IC 95%, 0.00-42.61) contro i 8.97 mesi (IC 95%, 5.16-12.78) delle pazienti senza mutazione patogenetica di questi geni. (Figura 6)

Non abbiamo invece osservato significative differenze in termini di PFS a partire dall'inizio del trattamento con PARP inibitore tra le pazienti con mutazioni in BRCA1 e quelle con mutazioni in BRCA2, essendo la PFS mediana di 19.32 mesi (IC 95%, 0.00-41.16) e di 13.08 mesi (IC 95%, 0.00-43.71), rispettivamente nelle pazienti BRCA1-mutate ed in quelle BRCA2-mutate ($p = 0.996$). (Figura 7)

Figura 6. Curva di Kaplan Meier per sopravvivenza libera da progressione a seconda della presenza (verde) o assenza di mutazioni patogenetiche in BRCA1 o BRCA2.

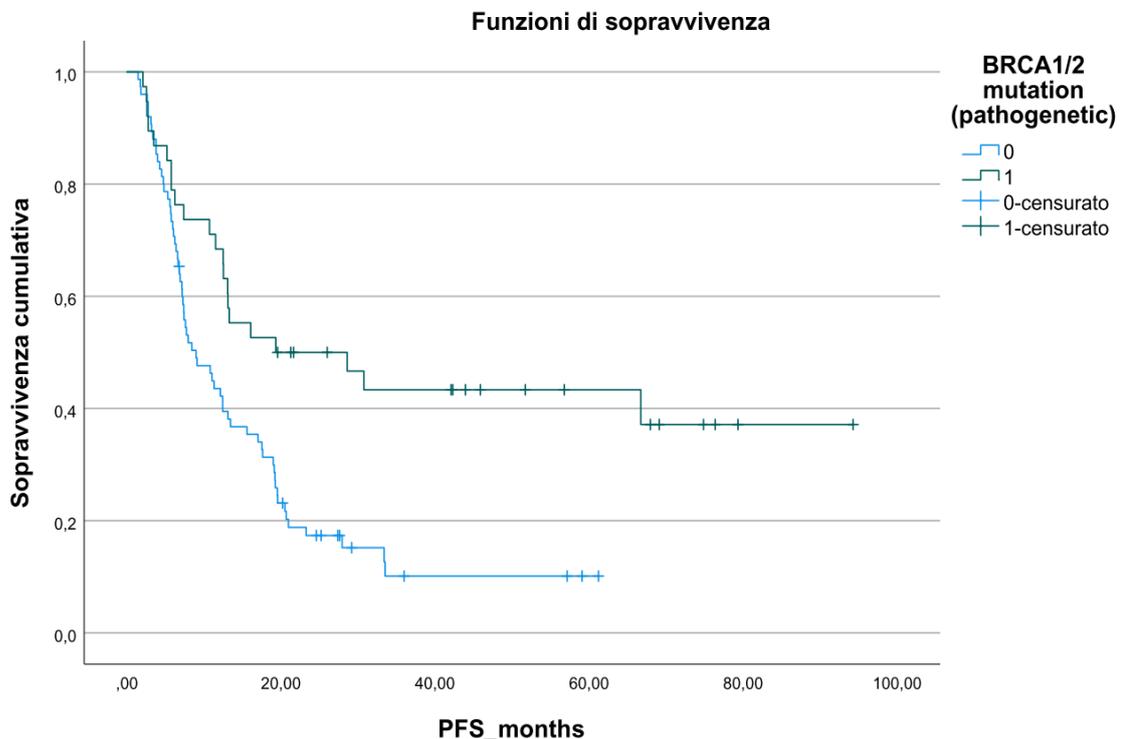
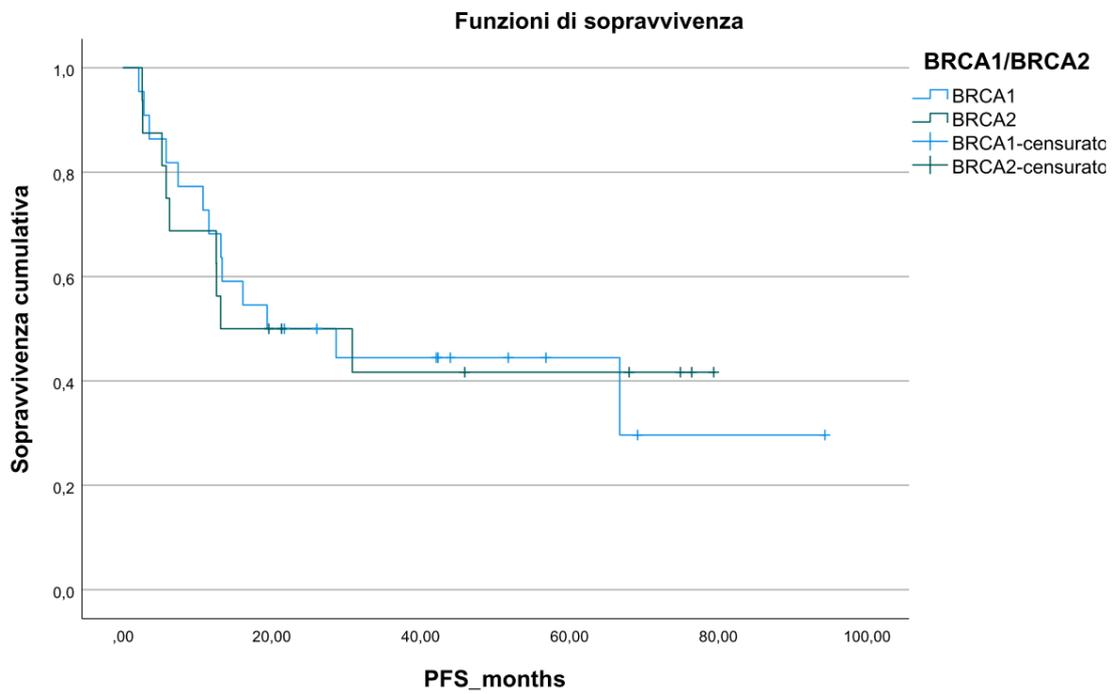


Figura 7. Curva di Kaplan Meier per sopravvivenza libera da progressione a seconda della presenza di mutazione in BRCA1 (azzurro) o in BRCA2 (verde).

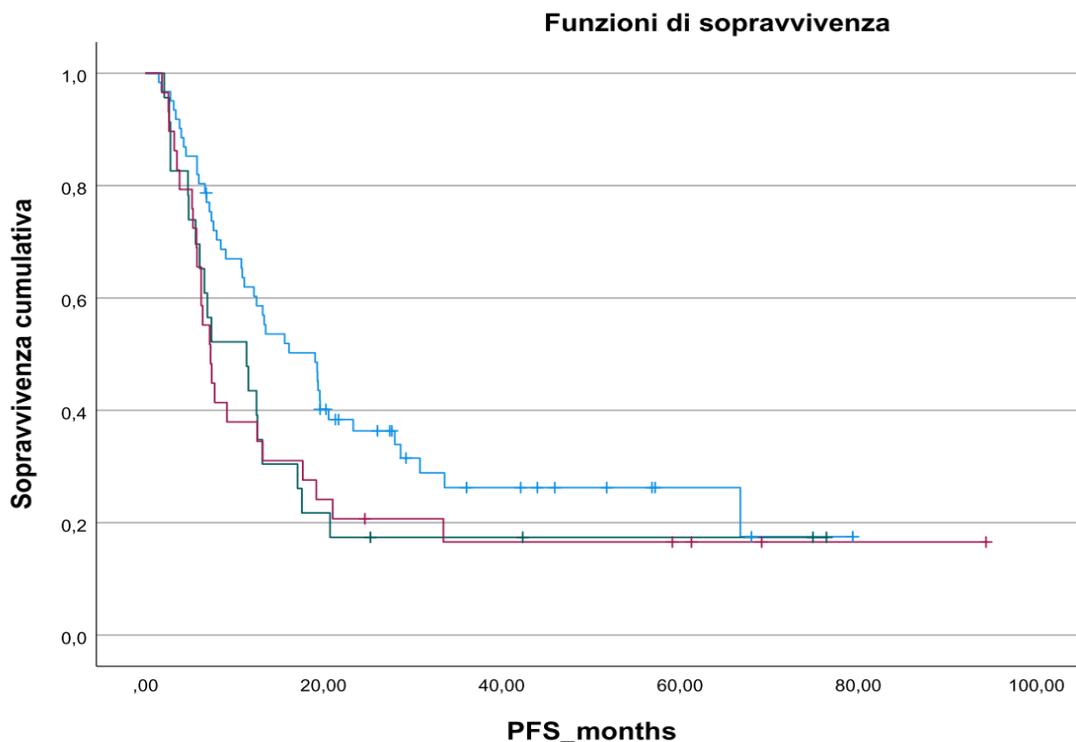


4.5. Fattori prognostici clinici associati a sopravvivenza libera da progressione in corso di PARP inibitore

Abbiamo quindi valutato l'impatto prognostico di diversi fattori clinico-patologici sulla PFS dall'inizio del trattamento con PARP inibitore e sono emersi come fattori significativamente relati alla PFS il numero di linee di chemioterapia ricevute prima dell'assunzione del PARP inibitore ($p=0.03$) ed il riscontro di una risposta radiologica (parziale o completa) nel corso della linea di chemioterapia immediatamente precedente alla terapia con PARP inibitore ($p=0.01$).

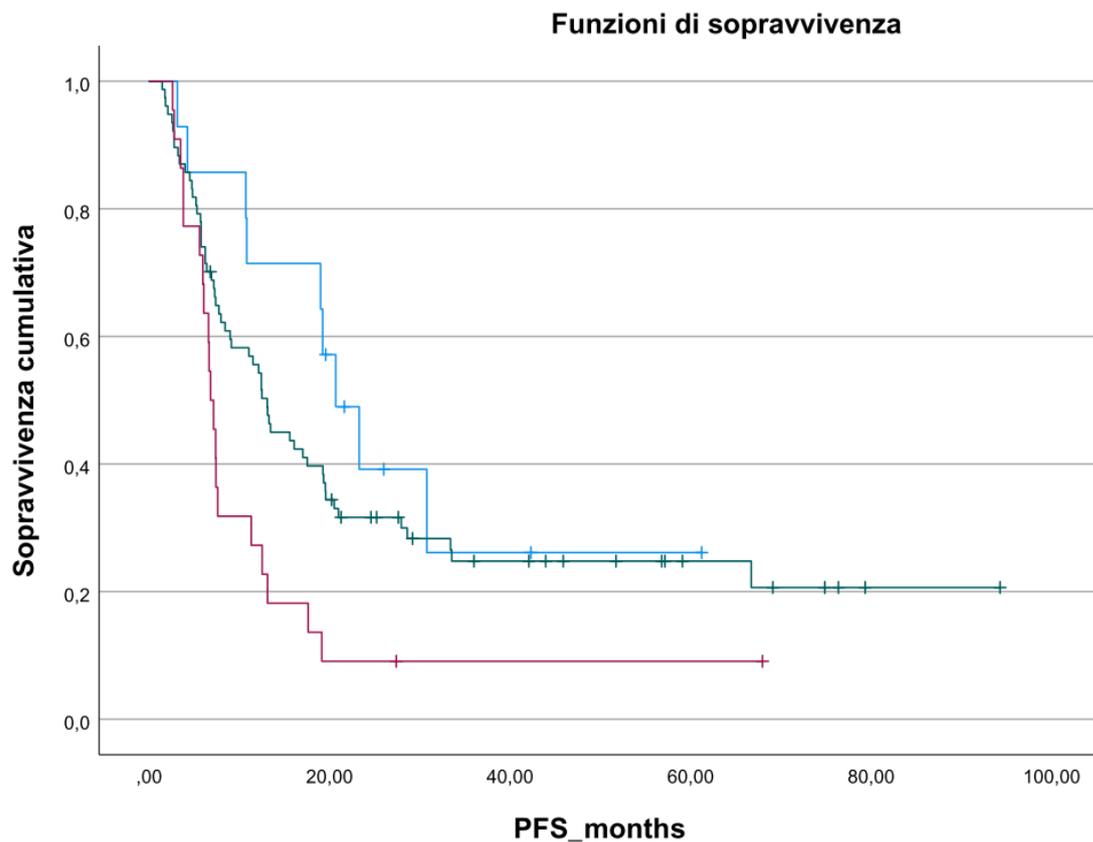
Infatti, le pazienti che hanno effettuato non più di due linee di chemioterapia prima di iniziare il trattamento a base di PARP inibitore hanno evidenziato una PFS significativamente migliore (con una PFS mediana 18.99 mesi, IC 95% 12.47-25.51) di quella delle pazienti che avevano ricevuto tre linee di chemioterapia o più (PFS mediana 7.36 mesi, IC 95%, 4.77-9.95; $p=0.03$). (Figura 8)

Figura 8. Curva di Kaplan Meier per sopravvivenza libera da progressione a seconda del numero di linee di chemioterapia pre-PARP inibitore. Azzurro: 2 linee; verde: 3 linee; rosso: 4 linee.



Anche il riscontro di una risposta radiologica parziale o completa al trattamento chemioterapico somministrato prima della somministrazione della terapia con PARP inibitore è stato associato ad un beneficio statisticamente significativo in termini di PFS. In corso di trattamento con PARP inibitore, la PFS mediana è stata di 13.08 mesi (IC 95%, 11.02-15.13) in caso di risposta radiologica completa e di 20.67 mesi (IC 95%, 14.66-26.67) in caso di risposta radiologica parziale, contro i 6.80 mesi (IC 95%, 5.90-7.71) in caso di malattia stabile al reperto radiologico post-chemioterapia (p=0.01). (Figura 9)

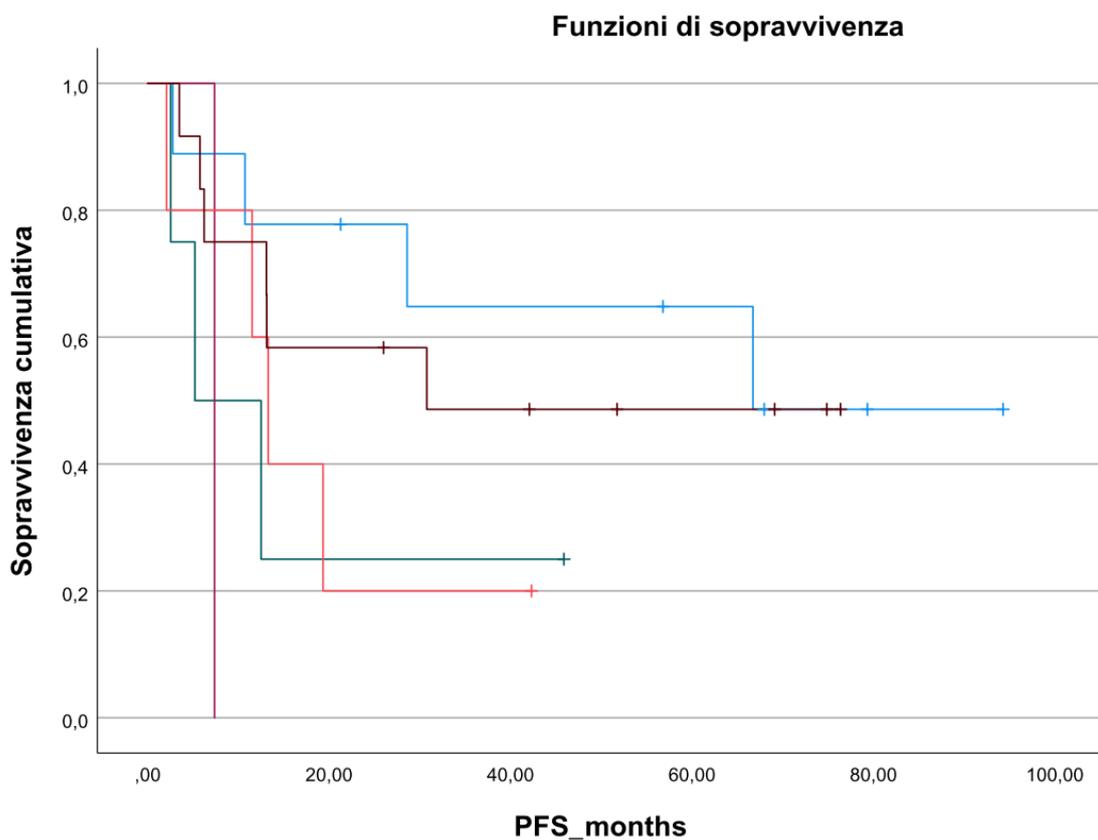
Figura 9. Curva di Kaplan Meier per sopravvivenza libera da progressione a seconda della risposta radiologica al trattamento chemioterapico eseguito prima della terapia con PARP inibitore. Azzurro: risposta completa; verde: risposta parziale; rosso: malattia stabile.



4.6. Impatto del dominio di mutazione sulla sopravvivenza libera da progressione in corso di PARP inibitore

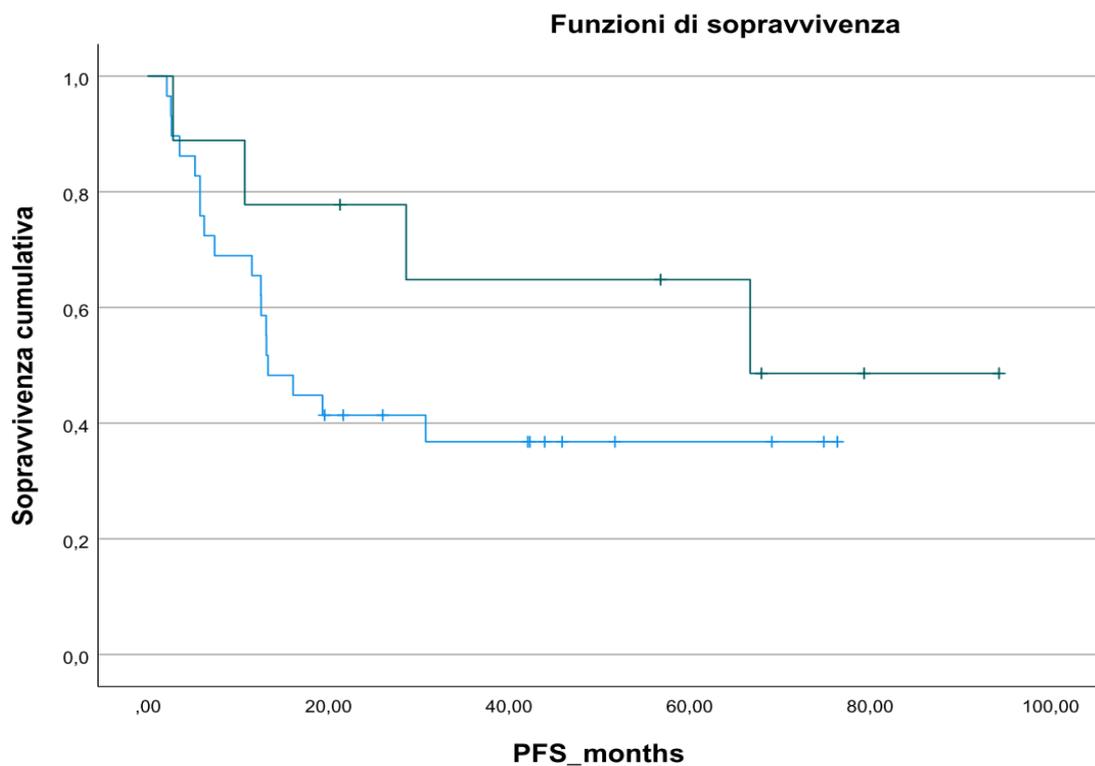
Nessuno tra i domini funzionali dei geni BRCA1 e BRCA2 è risultato significativamente associato a maggiore sopravvivenza delle pazienti nel caso in cui la mutazione del gene ricadesse al suo interno ($p=0.22$), sebbene nel grafico si osservi come le pazienti con mutazione del dominio DBD presentino una PFS numericamente migliore rispetto alle pazienti con mutazione in altre regioni dei geni BRCA1/2. (Figura 10)

Figura 10. Curva di Kaplan Meier per sopravvivenza libera da progressione a seconda del dominio mutato nei geni BRCA1/2. Azzurro: DBD; verde: RAD51-BD; rosso: RING; arancione: BRCT; marrone: altro.



Nella coorte di pazienti con mutazione BRCA, le pazienti con mutazioni del dominio DBD presentavano una PFS numericamente maggiore di quelle con mutazioni patogenetiche in altri domini, seppure tale differenza non raggiungesse la significatività statistica, probabilmente a causa del piccolo numero di pazienti valutabili ($p=0.18$). La PFS mediana non è stata raggiunta nel gruppo di pazienti con mutazione nel dominio DBD mentre è risultata pari a 16.01 mesi (IC 95%, 0.00-36.45) nel gruppo di pazienti in cui la mutazione ricadeva in domini funzionali dei geni BRCA diversi da DBD. (Figura 11)

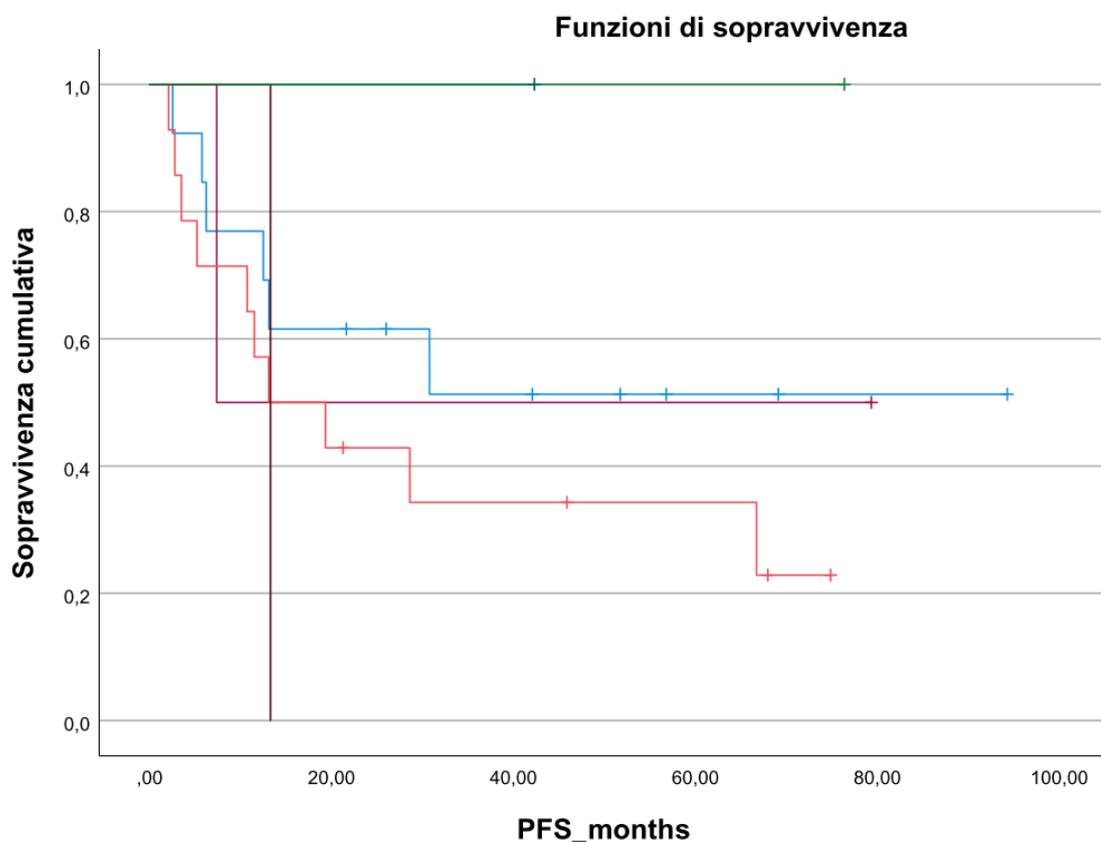
Figura 11. Curva di Kaplan Meier per sopravvivenza libera da progressione in presenza (verde) o assenza (azzurro) di mutazione nel dominio DBD di BRCA1 e BRCA2 in pazienti con mutazione patogenetica di BRCA1/2.



4.7. Impatto del tipo di mutazione sulla sopravvivenza libera da progressione in corso di PARP inibitore

La tipologia di mutazione dei geni BRCA1/2 non è risultata associarsi significativamente ad una diversa PFS delle pazienti ($p=0.60$), sebbene un trend verso una prognosi particolarmente favorevole sia stato osservato per le poche pazienti con alterazioni RGT. (Figura 12)

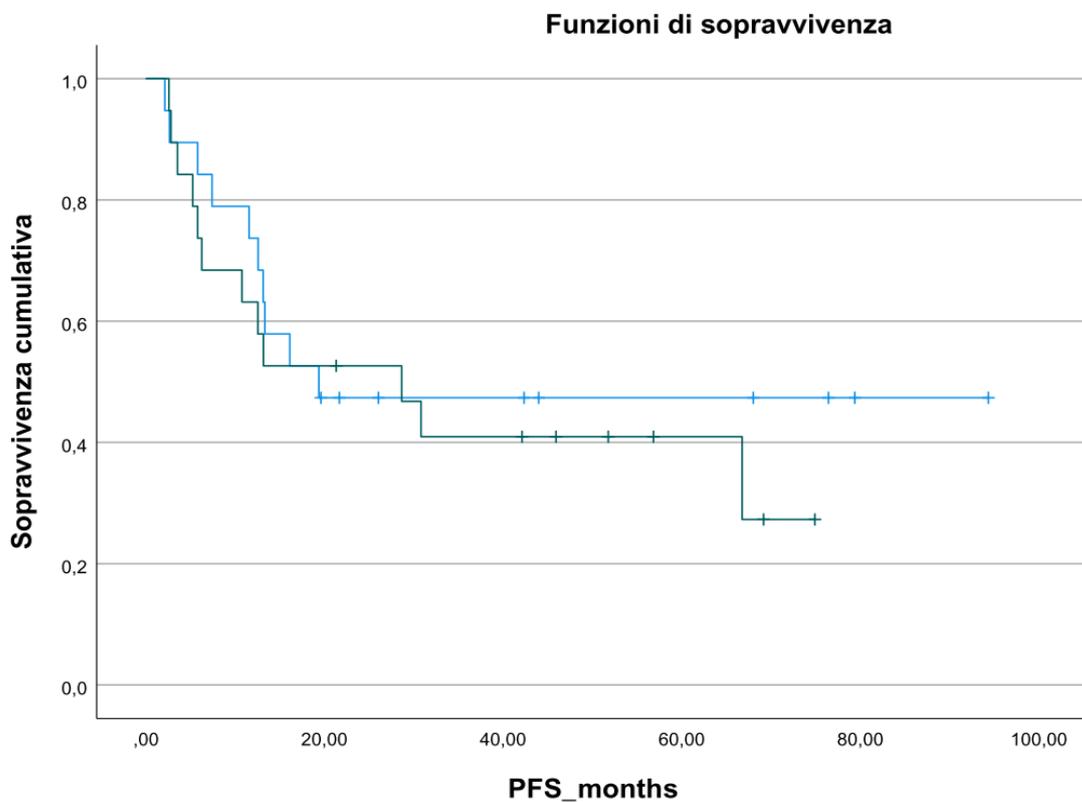
Figura 12. Curva di Kaplan Meier per sopravvivenza libera da progressione a seconda del tipo di mutazione nel gene BRCA1/2. Azzurro: frameshift; blu: in frame; rosso: missenso; arancione: non senso; marrone: splicing; verde: RGT.



4.8. Impatto della presenza di mutazioni coinvolgenti l'esone 11 sulla sopravvivenza libera da progressione in corso di PARP inibitore

Nella coorte di pazienti BRCA mutate, non sono state osservate significative differenze in termini di PFS tra le pazienti con mutazione dell'esone 11 e pazienti con mutazione in altre regioni dei geni BRCA: la PFS mediana è risultata pari a 28.58 mesi (IC 95%, NR-NR) nelle pazienti in cui la mutazione ricadeva nell'esone 11 contro i 19.32 mesi (CI 95%, 0.00-42.61) nelle pazienti in cui la mutazione non coinvolgeva l'esone 11 ($p=0.56$). (Figura 13)

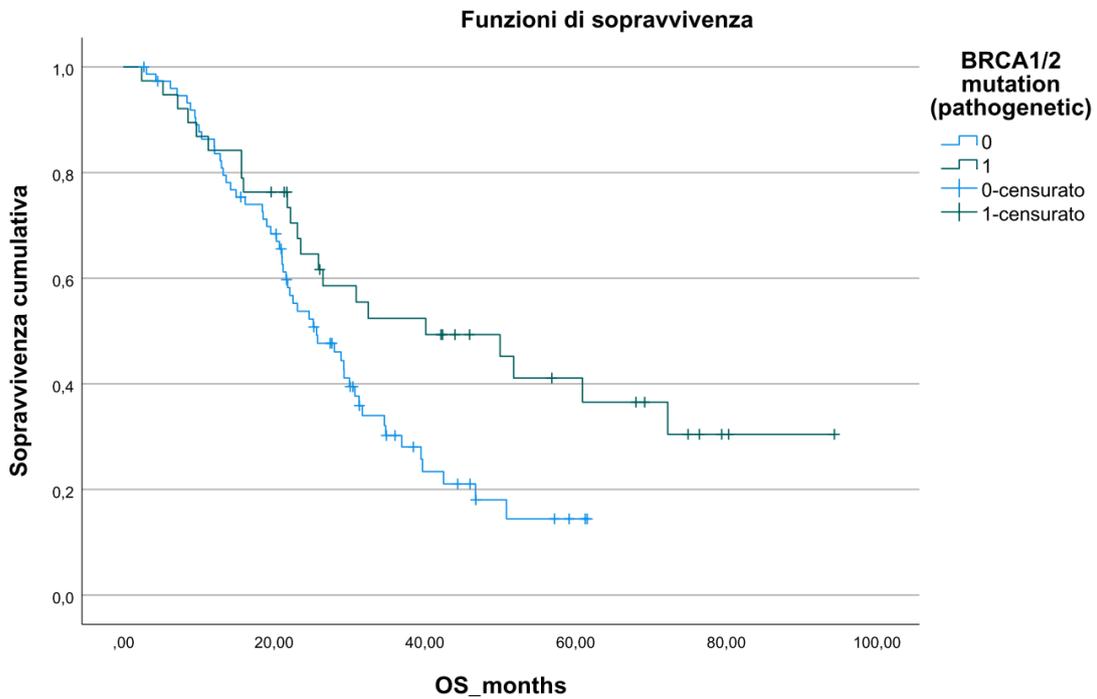
Figura 13. Curva di Kaplan Meier per sopravvivenza libera da progressione a seconda che la mutazione di BRCA1/2 ricada nell'esone 11 (verde) o in altre posizioni (azzurro) del gene.



4.9. Impatto delle mutazioni BRCA sulla sopravvivenza globale dall'inizio del trattamento con PARP inibitore

In linea con i dati della PFS, le pazienti con mutazioni patogenetiche dei geni BRCA1 e BRCA2 hanno mostrato una OS significativamente più prolungata in corso di trattamento con PARP inibitori rispetto alle pazienti senza mutazioni BRCA ($p < 0.001$). Per le pazienti con neoplasie BRCA-mutate, la OS mediana, calcolata a partire dall'inizio della somministrazione del PARP inibitore, è stata di 40.05 mesi (IC 95%, 15.80-64.30) contro i 25.56 mesi (IC 95%, 18.66-32.46) delle pazienti senza mutazione patogenetica di questi geni. (Figura 14)

Figura 14. Curva di Kaplan Meier per sopravvivenza globale a seconda della presenza (verde) o assenza di mutazioni patogenetiche in BRCA1 o BRCA2.

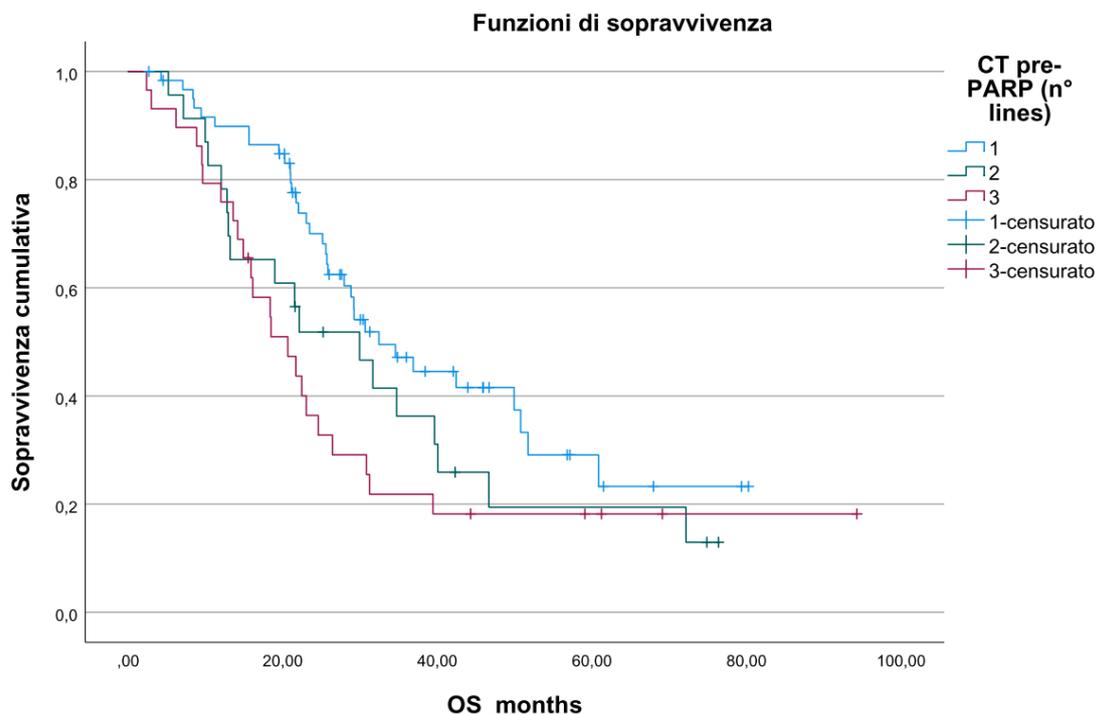


4.10. Fattori prognostici clinici associati a sopravvivenza globale in corso di PARP inibitore

Abbiamo quindi valutato l'impatto prognostico di diversi fattori clinico-patologici sulla OS dall'inizio del trattamento con PARP inibitore e sono emersi come fattori significativamente relati alla OS il numero di linee di chemioterapia ricevute prima dell'assunzione del PARP inibitore ($p=0.04$) ed il riscontro di una risposta radiologica (parziale o completa) nel corso della linea di chemioterapia immediatamente precedente alla terapia con PARP inibitore ($p<0.01$).

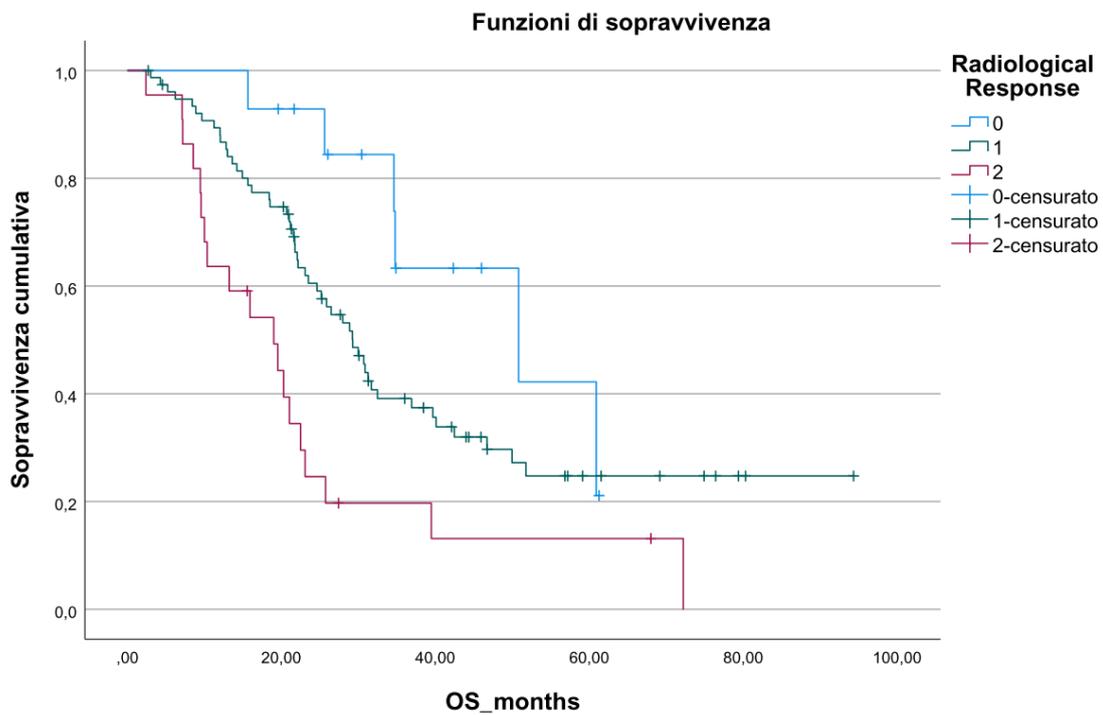
Infatti, le pazienti che hanno effettuato non più di due linee di chemioterapia prima di iniziare il trattamento a base di PARP inibitore hanno evidenziato una OS significativamente migliore (con una OS mediana 32.43 mesi, IC 95% 23.38-41.47) di quella delle pazienti che avevano ricevuto tre linee di chemioterapia o più (OS mediana 29.93 mesi, IC 95%,15.92-43.94, e OS mediana 20.63 mesi, IC 95% 13.56-27.71, rispettivamente per le pazienti che avevano precedentemente ricevuto 3 linee di chemioterapia o più di 3 linee di chemioterapia; $p=0.04$). (Figura 15)

Figura 15. Curva di Kaplan Meier per sopravvivenza globale a seconda del numero di linee di chemioterapia pre-PARP inibitore. Azzurro: 2 linee; verde: 3 linee; rosso: 4 linee.



Anche il riscontro di una risposta radiologica parziale o completa al trattamento chemioterapico somministrato prima della somministrazione della terapia con PARP inibitore è stato associato ad un beneficio statisticamente significativo in termini OS. In corso di trattamento con PARP inibitore, la OS mediana è stata di 50.76 mesi (IC 95%, 21.09-80.43) in caso di risposta radiologica completa e di 29.21 mesi (IC 95%, 24.43-33.98) in caso di risposta radiologica parziale, contro i 18.96 mesi (IC 95%, 9.92-28.00) in caso di malattia stabile al reperto radiologico post-chemioterapia ($p < 0.01$). (Figura 16)

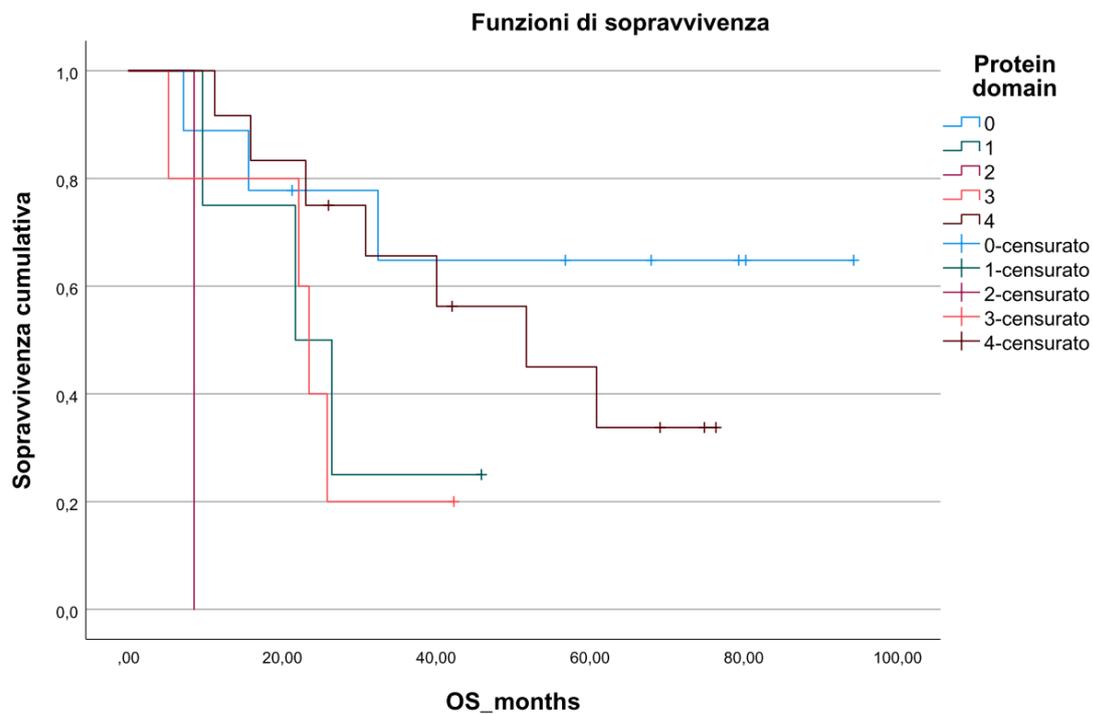
Figura 16. Curva di Kaplan Meier per sopravvivenza globale a seconda della risposta radiologica al trattamento chemioterapico eseguito prima della terapia con PARP inibitore. Azzurro: risposta completa; verde: risposta parziale; rosso: malattia stabile.



4.11. Impatto del dominio di mutazione sulla sopravvivenza globale in corso di PARP inibitore

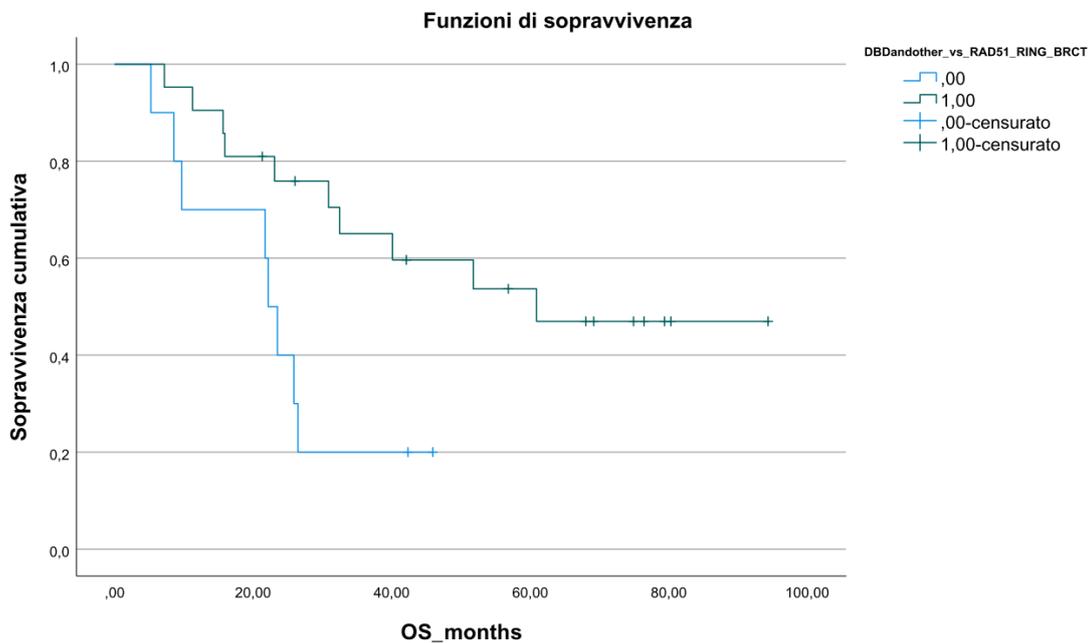
Il dominio funzionale dei geni BRCA1 e BRCA2 in cui ricadeva la mutazione è risultato un fattore prognostico associato alla sopravvivenza globale delle pazienti ($p=0.01$). In particolare, la OS mediana delle pazienti con mutazione del dominio DBD non è stata raggiunta, contro una OS di 21.68 mesi (IC 95%, 5.23-38.14), 8.51 mesi (IC 95%, ND-ND), 23.46 mesi (IC 95%, 20.57-26.35), 51.71 mesi (IC 95%, 20.11-83.32), rispettivamente nelle pazienti con mutazione del dominio RAD-51BD, RING, BRCT e con mutazione che ricadeva in domini diversi da RAD51-BD, RING e BRCT. (Figura 17)

Figura 17. Curva di Kaplan Meier per sopravvivenza globale a seconda del dominio mutato nei geni BRCA1/2. Azzurro, DBD; verde, RAD51-BD; rosso, RING; arancione, BRCT; marrone, altro.



Nella coorte di pazienti con mutazione BRCA, le pazienti con mutazioni del dominio DBD presentavano una OS numericamente maggiore di quelle in cui la mutazione ricade nei domini RAD51-BD, RING e BRCT ($p=0.02$). La OS mediana del gruppo di pazienti con mutazione dei domini RAD51-BD, RING e BRCT è pari a 22.11 mesi (IC 95%, 19.36-24.86). (Figura 18)

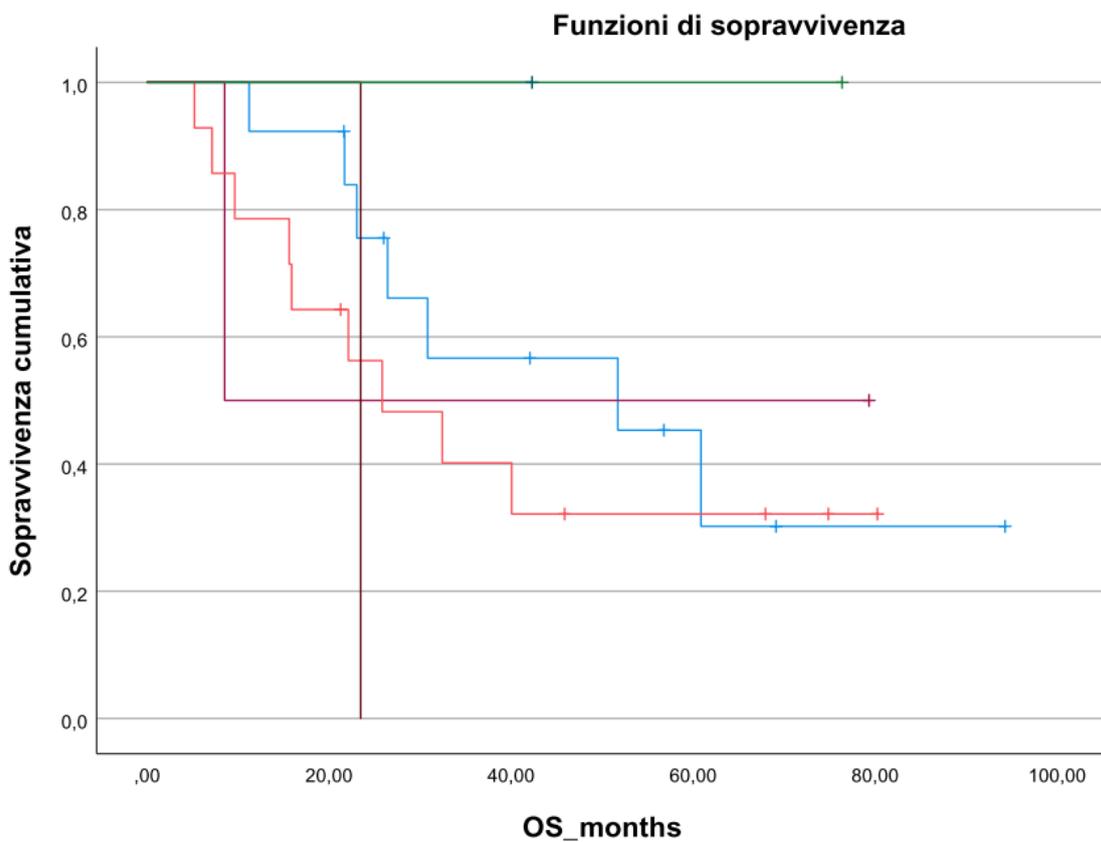
Figura 18. Curva di Kaplan Meier per sopravvivenza globale in presenza di mutazione nel dominio DBD (verde) o in presenza di mutazione nel dominio RAD51-BD, RING o BRCT (azzurro) di BRCA1 e BRCA2 in pazienti con mutazione patogenetica di BRCA1/2.



4.12. Impatto del tipo di mutazione sulla sopravvivenza globale in corso di PARP inibitore

La tipologia di mutazione dei geni BRCA1/2 non è risultata significativamente associata ad una diversa OS delle pazienti ($p=0.64$), sebbene anche in questo caso sia stata osservato un trend verso un'ottima prognosi per le poche pazienti con alterazioni RGT. (Figura 19)

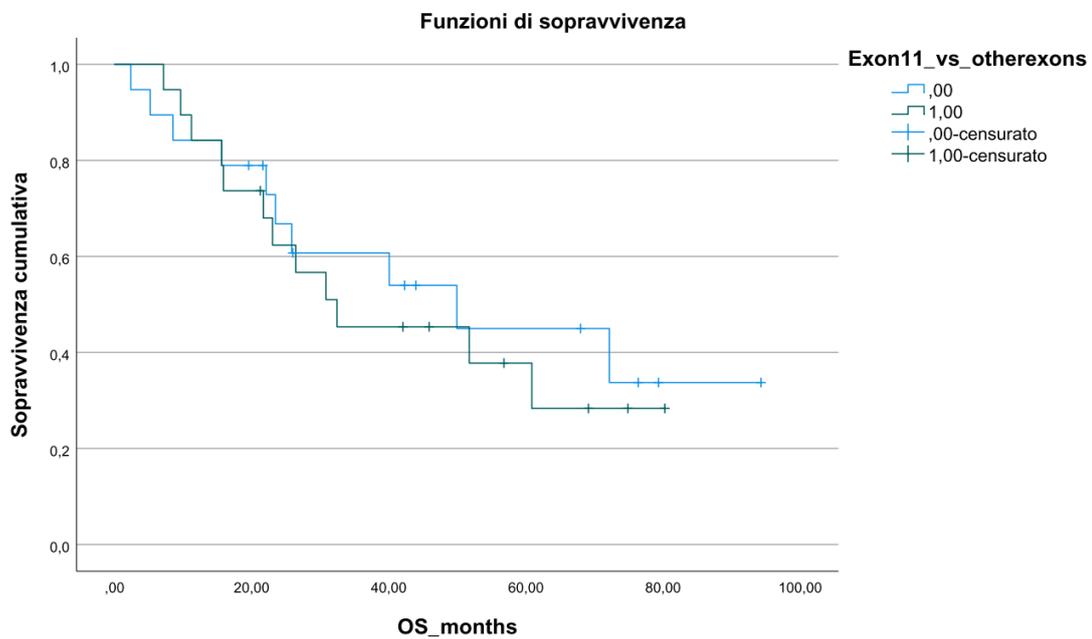
Figura 19. Curva di Kaplan Meier per sopravvivenza globale a seconda del tipo di mutazione nel gene BRCA1/2. Azzurro: frameshift; blu: in frame; rosso: missenso; arancione: non senso; marrone: splicing; verde: RGT.



4.13. Impatto della presenza di mutazioni coinvolgenti l'esone 11 sulla sopravvivenza globale in corso di PARP inibitore

Nella coorte di pazienti BRCA mutate, non sono state osservate differenze significative in termini di OS tra le pazienti con mutazione dell'esone 11 e pazienti con mutazione in altre regioni dei geni BRCA: la OS mediana è risultata pari a 49.91 mesi (IC 95%, 10.74-89.07) nelle pazienti in cui la mutazione ricadeva nell'esone 11 contro i 32.43 mesi (CI 95%, 1.65-63.20) nelle pazienti in cui la mutazione non coinvolgeva l'esone 11 ($p=0.65$). (Figura 20)

Figura 20. Curva di Kaplan Meier per sopravvivenza globale a seconda che la mutazione di BRCA1/2 ricada nell'esone 11 (verde) o in altre posizioni (azzurro) del gene.



5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Questo studio retrospettivo monocentrico ha incluso una coorte *real-world* di 113 pazienti con recidiva platino-sensibile di carcinoma ovarico trattate con PARP inibitori come terapia di mantenimento dopo chemioterapia nell'ambito della pratica clinica.

Come atteso, il 90% delle pazienti arruolate nello studio avevano ricevuto diagnosi di tumore con istologia sierosa di alto grado.

La presenza di una mutazione patogenetica a carico dei geni BRCA1 e BRCA2, di tipo germinale o somatico, è stata riscontrata nel 34% delle pazienti. Questa percentuale si discosta dall'epidemiologia italiana, in cui le mutazioni dei geni BRCA incorrono nel 17-20% dei tumori sierosi di alto grado, istotipo che presenta la maggior frequenza di mutazioni in questi geni, e sono solo sporadiche nei carcinomi ovarici con altro istotipo. Bisogna tuttavia considerare come durante il primo periodo di utilizzo dei PARP inibitori nella pratica clinica fosse disponibile come unico farmaco olaparib, farmaco tutt'ora registrato dalle agenzie regolatorie per l'utilizzo nelle sole pazienti BRCA mutate. La coorte in esame, che comprende pazienti trattate con PARP inibitori a partire dal 2015, include un numero consistente di pazienti trattate in questo primo periodo, presentando quindi una selezione a favore del sottogruppo di pazienti con mutazioni dei geni BRCA1 e BRCA2. Inoltre, considerando che uno degli obiettivi del nostro studio è valutare gli effetti delle diverse varianti alleliche dei geni BRCA sulla risposta ai PARP inibitori, questa maggiore rappresentanza delle pazienti BRCA mutate ha permesso di avere un più consistente numero di pazienti utili a questo scopo, anche considerando la scarsa numerosità del campione complessivo.

Il nostro studio ha confermato l'efficacia dell'utilizzo dei PARP inibitori come terapia di mantenimento nelle pazienti con diagnosi di carcinoma ovarico di alto grado, dando risultati compatibili con i risultati dei trial clinici registrativi. I nostri risultati sono riferiti ad una coorte di pazienti trattate nella pratica clinica, e pertanto meno selezionata rispetto alle pazienti incluse nei trial clinici registrativi.

Nella nostra coorte di pazienti è stata osservata una PFS mediana di 12.42 mesi (IC 95%, 10.36-14.48) a partire dalla data d'inizio del trattamento con PARP inibitori.

Tra le pazienti arruolate nel nostro studio, 68 (60.2%) hanno ricevuto niraparib come PARP inibitore; si confrontano quindi i nostri risultati con quelli dello studio registrativo di niraparib NOVA. Nello studio NOVA la PFS mediana delle pazienti con mutazione dei geni BRCA è stata di 21 mesi, mentre la PFS nella coorte non-BRCA mutata è stata di 9.3 mesi. Dal momento che solo il 33.6% delle pazienti arruolate nel nostro studio sono risultate BRCA-mutate, si può desumere come i nostri risultati siano tutto sommato in linea con quelli dello studio registrativo.

Come atteso, la PFS mediana osservata nelle pazienti con mutazione patogenetica dei geni BRCA è stata significativamente superiore rispetto alle pazienti *wild type* per questi geni, attestandosi rispettivamente a 19.32 mesi (IC 95%, 0.00-42.61) nelle pazienti BRCA-mutate ed a 8.97 mesi (IC 95%, 5.16-12.78) nelle non-BRCA mutate ($p < 0.001$).

Delle 38 pazienti BRCA mutate incluse nel nostro studio, 29 sono state trattate con olaparib, 8 con niraparib e una sola con rucaparib; si confrontano quindi i nostri risultati con quelli dello studio registrativo di olaparib SOLO2, condotto su pazienti con carcinoma ovarico BRCA-mutato. Nello studio SOLO2 la sopravvivenza libera da progressione mediana riscontrata nel gruppo di pazienti trattate con olaparib è stata di 19.1 mesi (IC 95%, 16.3-25.7), dato in linea con i nostri risultati.

Tra le caratteristiche clinico-patologiche abbiamo evidenziato come il numero di trattamenti chemioterapici effettuati prima dell'inizio della terapia a base di PARP inibitore e la risposta radiologica ottenuta all'ultimo trattamento chemioterapico eseguito impattassero significativamente sulla PFS.

In particolare, le pazienti che avevano ricevuto solo due linee di trattamento chemioterapico prima dell'avvio della terapia di mantenimento presentavano una PFS in corso di terapia con PARP inibitore significativamente superiore rispetto alle pazienti che avevano ricevuto tre linee chemioterapiche o più. Può risultare intuibile come la somministrazione di un maggior numero di linee di chemioterapia a base di platino prima della terapia con PARP inibitori possa correlare con la progressiva acquisizione di una maggior resistenza alla terapia a base di Sali di platino e quindi anche con un aumentato rischio di mancata o ridotta risposta alla terapia con PARP inibitori.

Inoltre, nel nostro studio, le pazienti con riscontro di una risposta radiologica parziale o completa a seguito dell'ultima linea di chemioterapia somministrata prima dell'avvio del mantenimento con PARP inibitore presentavano una PFS significativamente superiore rispetto alle pazienti con riscontro radiologico di stabilità di malattia. Tale osservazione conferma la nota correlazione tra risposta del tumore alla chemioterapia a base di platino e sensibilità dello stesso ai PARP inibitori, che è già di fatto sfruttata nella pratica clinica per selezionare i pazienti migliori candidati alla terapia con PARP inibitori (in quanto solo pazienti con risposta clinica ad una nuova linea a base di Sali di platino sono candidabili a ricevere PARP inibitori).

Tra i domini funzionali più frequentemente coinvolti dalla mutazione patogenetica di BRCA1 o BRCA2 nelle pazienti in esame vi erano i domini DBD di BRCA1 (16% delle mutazioni complessivamente diagnosticate nei geni BRCA) e di BRCA2 (8%), ed il dominio RAD51-BD in BRCA2 (11%). Inoltre, nel 55% dei casi le mutazioni ricadevano nell'esone 11 di uno dei due geni BRCA.

Nel nostro studio, abbiamo osservato come le pazienti con mutazione del dominio DBD di BRCA1 o BRCA2 presentassero una PFS numericamente più lunga rispetto alle pazienti in cui la mutazione ricadeva in altri domini dei geni BRCA, sebbene tale differenza non raggiungesse la significatività statistica ($p=0.18$), probabilmente a causa della piccola numerosità del campione di pazienti con mutazioni BRCA1/BRCA2 che abbiamo potuto analizzare.

Lo stesso dicasi per quanto riguarda la OS mediana: le pazienti con mutazione del dominio DBD di BRCA1 o BRCA2 presentavano una OS significativamente più prolungata rispetto a pazienti con mutazione nei domini RAD51-BD, RING e BRCT ($p=0.02$).

Tali risultati sono di fatto in linea con quanto riscontrato in una analisi traslazionale dello studio PAOLA1 (86), che testava l'aggiunta di olaparib a bevacizumab come trattamento di mantenimento dopo una chemioterapia a base di Sali di platino. Valutando pazienti che presentavano mutazioni patogenetiche che coinvolgevano diversi domini di BRCA1 e BRCA2 è stato infatti riscontrato come queste presentassero una diversa prognosi. Nello specifico, le pazienti con mutazione di BRCA1 localizzata nel dominio DBD apparivano trarre un maggior beneficio dall'aggiunta di olaparib a bevacizumab rispetto alle pazienti che presentavano una qualsiasi altra mutazione in altri domini di BRCA1 ($HR=0.08$, $p=0.03$). Inoltre, tra le 13 pazienti con mutazioni nel dominio DBD di BRCA2 solo 1 paziente su 13 ha presentato una recidiva, con entrambi i bracci di trattamento che hanno mostrato risultati eccellenti, nonostante si presentassero con HGOC in stadio avanzato (PFS a 24 mesi del 100% contro 90%, rispettivamente per placebo+bevacizumab e olaparib+bevacizumab).

Nello studio PAOLA1 i ricercatori hanno inoltre osservato che alcune mutazioni, ad esempio quelle localizzate nel dominio DBD di BRCA1, erano esclusivamente NS o FS e pertanto sono andati a valutare se il tipo di mutazione, piuttosto che la sua posizione, si associasse ad un maggiore beneficio ottenuto da olaparib più bevacizumab. Dopo aver eseguito le dovute analisi statistiche, non si è tuttavia evidenziata una specifica associazione tra il tipo di mutazione ed il beneficio di olaparib più bevacizumab. Consistentemente, nel nostro studio, non abbiamo osservato una associazione significativa tra tipo di mutazione e la prognosi delle pazienti.

Analogamente, il gruppo di pazienti con mutazione dell'esone 11 di BRCA1 o BRCA2 hanno avuto una PFS numericamente superiore rispetto al gruppo di pazienti BRCA-mutate in cui la mutazione del gene ricadesse esternamente all'esone 11, sebbene tale differenza non raggiungesse la significatività statistica.

I nostri risultati sono risultati pertanto in linea con quelli del già citato studio PAOLA1 (86), in cui è stato osservato che le pazienti con alterazione dell'esone 11 tendevano a trarre

dall'aggiunta dell'olaparib al bevacizumab benefici maggiori rispetto alle pazienti in cui la mutazione ricadeva al di fuori dell'esone 11, senza però che tale differenza raggiungesse la significatività statistica.

In merito alle mutazioni coinvolgenti l'esone 11, è interessante considerare anche i risultati di altri due studi retrospettivi. Il primo, pubblicato nel 2016 e condotto su linee cellulari, ha evidenziato come tumori con mutazioni di BRCA1 situate all'interno dell'esone 11 presentassero una parziale resistenza ai farmaci derivati del platino ed ai farmaci inibitori di PARP, in contrasto con quanto osservato nel nostro studio e nello studio PAOLA1 (44). Va tuttavia sottolineato come si tratti di una evidenza preclinica, basata sullo studio di linee cellulari e non su dati provenienti dal trattamento di pazienti. Un secondo studio, pubblicato nel 2018 e condotto su un piccolo numero di pazienti (n=78) ha evidenziato come tra le pazienti portatrici di mutazione in BRCA2, quelle in cui la mutazione è localizzata nel dominio RAD51-BD (che si sovrappone all'esone 11) presentino una sopravvivenza prolungata e maggiore sensibilità al platino (45).

Il ruolo delle mutazioni dell'esone 11 dei geni BRCA sulla sensibilità ai farmaci inibitori di PARP rimane quindi incerto.

Il nostro studio presenta alcuni significativi limiti, si tratta infatti di uno studio retrospettivo e monocentrico, che ha incluso un numero limitato di pazienti con mutazione BRCA. Pertanto, l'impatto prognostico da noi osservato di mutazioni che coinvolgano il DBD dei geni BRCA dovrebbe essere confermata in altri studi di maggiori dimensioni. Va tuttavia sottolineato come nella relativa scarsità di informazioni relative all'impatto del dominio di mutazione nel contesto della patologia ovarica trattata con PARP inibitori, la nostra osservazione, che è di fatto consistente con quella del maggior studio condotto in merito (analisi traslazionale dello studio PAOLA1), presenti comunque un interesse clinico in quanto, se confermata, potrebbe permettere di selezionare pazienti a miglior prognosi.

Concludendo, il nostro studio retrospettivo monocentrico ha confermato, in una coorte di pazienti *real-world*, l'efficacia del trattamento con PARP inibitori per la terapia di mantenimento delle recidive di carcinoma ovarico, evidenziando risultati simili a quelli degli studi clinici registrativi.

Abbiamo inoltre osservato come tra le pazienti con mutazione patogenetica dei geni BRCA1 e BRCA2, la localizzazione della mutazione nel dominio DBD si associ ad una miglior prognosi, che potrebbe potenzialmente dipendere sia da un maggior beneficio dalla terapia con PARP inibitori che da un maggior beneficio dal trattamento successivo a base di Sali di platino. Tale risultato dovrebbe essere validato in uno studio multicentrico di maggiori dimensioni.

Bibliografia

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021 May;71(3):209–49.
2. Tumori R. I NUMERI DEL CANCRO IN ITALIA 2021 [Internet]. Available from: www.medinews.it
3. Babic A, Sasamoto N, Rosner BA, Tworoger SS, Jordan SJ, Risch HA, et al. Association between Breastfeeding and Ovarian Cancer Risk. *JAMA Oncol*. 2020 Jun 1;6(6).
4. Schrijver LH, Mooij TM, Pijpe A, Sonke GS, Mourits MJE, Andrieu N, et al. Oral Contraceptive Use in BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers: Absolute Cancer Risks and Benefits. *J Natl Cancer Inst*. 2022 Apr 1;114(4):540–52.
5. Prat J, D'Angelo E, Espinosa I. Ovarian carcinomas: at least five different diseases with distinct histological features and molecular genetics. *Hum Pathol*. 2018 Oct 1;80:11–27.
6. Jiang X, Morland SJ, Hitchcock A, Thomas EJ, Campbell IG. Allelo typing of Endometriosis with Adjacent Ovarian Carcinoma Reveals Evidence of a Common Lineage1 [Internet]. Vol. 58, *CANCER RESEARCH*. 1998. Available from: <http://aacrjournals.org/cancerres/article-pdf/58/8/1707/2469034/cr0580081707.pdf>
7. Komiyama SI, Aoki D, Tominaga E, Susumu N, Udagawa Y, Nozawa S. Prognosis of Japanese Patients with Ovarian Clear Cell Carcinoma Associated with Pelvic Endometriosis: Clinicopathologic Evaluation [Internet]. 1999. Available from: <http://www.idealibrary.com>
8. Tsang YT, Deavers MT, Sun CC, Kwan SY, Kuo E, Malpica A, et al. KRAS (but not BRAF) mutations in ovarian serous borderline tumour are associated with recurrent low-grade serous carcinoma. *Journal of Pathology*. 2013 Dec;231(4):449–56.
9. Singer G, Iii RO, Cohen Y, Wang BG, Sidransky D, Kurman RJ, et al. BRIEF COMMUNICATION Mutations in BRAF and KRAS Characterize the Development of Low-Grade Ovarian Serous Carcinoma [Internet]. 2003. Available from: <https://academic.oup.com/jnci/article/95/6/484/2520660>
10. Mackenzie R, Kommos S, Winterhoff BJ, Kipp BR, Garcia JJ, Voss J, et al. Targeted deep sequencing of mucinous ovarian tumors reveals multiple overlapping RAS-pathway activating mutations in borderline and cancerous neoplasms. *BMC Cancer*. 2015 May 19;15(1).
11. Wiegand KC, Shah SP, Al-Agha OM, Zhao Y, Tse K, Zeng T, et al. ARID1A Mutations in Endometriosis-Associated Ovarian Carcinomas. *New England Journal of Medicine*. 2010 Oct 14;363(16):1532–43.
12. González-Martín A, Harter P, Leary A, Lorusso D, Miller RE, Pothuri B, et al. Newly diagnosed and relapsed epithelial ovarian cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*. 2023 Oct;

13. Alsop K, Fereday S, Meldrum C, DeFazio A, Emmanuel C, George J, et al. BRCA mutation frequency and patterns of treatment response in BRCA mutation-positive women with ovarian cancer: A report from the Australian ovarian cancer study group. *Journal of Clinical Oncology*. 2012 Jul 20;30(21):2654–63.
14. Li H, Liu ZY, Wu N, Chen YC, Cheng Q, Wang J. PARP inhibitor resistance: The underlying mechanisms and clinical implications. Vol. 19, *Molecular Cancer*. BioMed Central Ltd.; 2020.
15. Gadducci A, Guerrieri ME. PARP inhibitors alone and in combination with other biological agents in homologous recombination deficient epithelial ovarian cancer: From the basic research to the clinic. Vol. 114, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. Elsevier Ireland Ltd; 2017. p. 153–65.
16. Berek JS, Renz M, Kehoe S, Kumar L, Friedlander M. Cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum: 2021 update. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*. 2021 Oct 1;155(S1):61–85.
17. Vergote I, Tropé CG, Kristensen GB, Ehlen T, Johnson N, Verheijen RHM, et al. Neoadjuvant Chemotherapy or Primary Surgery in Stage IIIC or IV Ovarian Cancer Abstract [Internet]. Vol. 363, *N Engl J Med*. 2010. Available from: <http://groups.eortc.be/qol/>
18. Kehoe S, Hook J, Nankivell M, Jayson GC, Kitchener H, Lopes T, et al. Primary chemotherapy versus primary surgery for newly diagnosed advanced ovarian cancer (CHORUS): An open-label, randomised, controlled, non-inferiority trial. *The Lancet*. 2015 Jul 18;386(9990):249–57.
19. Böhm S, Faruqi A, Said I, Lockley M, Brockbank E, Jeyarajah A, et al. Chemotherapy response score: Development and validation of a system to quantify histopathologic response to neoadjuvant chemotherapy in tubo-ovarian high-grade serous carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*. 2015 Aug 1;33(22):2457–63.
20. Purwar R, Ranjan R, Soni K, Pandey M, Upadhyay SK, Pai E, et al. Lymphadenectomy in ovarian cancers: a meta-analysis of hazard ratios from randomized clinical trials. Vol. 20, *World Journal of Surgical Oncology*. BioMed Central Ltd; 2022.
21. Vasey PA, Jayson GC, Gordon A, Gabra H, Coleman R, Atkinson R, et al. Phase III randomized trial of docetaxel-carboplatin versus paclitaxel-carboplatin as first-line chemotherapy for ovarian carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 2004 Nov 17;96(22):1682–91.
22. Cancer O. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines[®]) NCCN.org NCCN Guidelines for Patients[®] available at www.nccn.org/patients [Internet]. 2023. Available from: www.nccn.org/patients
23. Baert T, Ferrero A, Sehouli J, O'Donnell DM, González-Martín A, Joly F, et al. The systemic treatment of recurrent ovarian cancer revisited. Vol. 32, *Annals of Oncology*. Elsevier Ltd; 2021. p. 710–25.
24. Colombo N, Sessa C, Du Bois A, Ledermann J, McCluggage WG, McNeish I, et al. ESMO-ESGO consensus conference recommendations on ovarian cancer: Pathology

- and molecular biology, early and advanced stages, borderline tumours and recurrent disease. *Annals of Oncology*. 2019 May 1;30(5):672–705.
25. Pujade-Lauraine E, Hilpert F, Weber B, Reuss A, Poveda A, Kristensen G, et al. Bevacizumab combined with chemotherapy for platinum-resistant recurrent ovarian cancer: The AURELIA open-label randomized phase III trial. *Journal of Clinical Oncology*. 2014 May 1;32(13):1302–8.
 26. moore-et-al-2023-phase-iii-mirasol-(gog-3045-engot-ov55)-study-initial-report-of-mirvetuximab-soravtansine-vs.
 27. Heo YA. Mirvetuximab Soravtansine: First Approval. *Drugs*. 2023 Feb 1;83(3):265–73.
 28. Pignata S, Scambia G, Bologna A, Signoriello S, Vergote IB, Wagner U, et al. *JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY*. 2017; Available from: <https://doi.org/10.1200/JCO.2017>.
 29. Colombo N, Gadducci A, Sehouli J, Rulli E, Mäenpää J, Sessa C, et al. INOVATYON/ENGOT-ov5 study: Randomized phase III international study comparing trabectedin/pegylated liposomal doxorubicin (PLD) followed by platinum at progression vs carboplatin/PLD in patients with recurrent ovarian cancer progressing within 6-12 months after last platinum line. *Br J Cancer*. 2023 Apr 1;128(8):1503–13.
 30. Aghajanian C, Blank S V., Goff BA, Judson PL, Teneriello MG, Husain A, et al. OCEANS: A randomized, double-blind, placebo-controlled phase III trial of chemotherapy with or without bevacizumab in patients with platinum-sensitive recurrent epithelial ovarian, primary peritoneal, or fallopian tube cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2012 Jun 10;30(17):2039–45.
 31. Poveda A, Vergote I, Tjulandin S, Kong B, Roy M, Chan S, et al. Trabectedin plus pegylated liposomal doxorubicin in relapsed ovarian cancer: Outcomes in the partially platinum-sensitive (platinum-free interval 6-12 months) subpopulation of OVA-301 phase III randomized trial. *Annals of Oncology*. 2011 Jan 1;22(1):39–48.
 32. Harter P, Sehouli J, Vergote I, Ferron G, Reuss A, Meier W, et al. Randomized Trial of Cytoreductive Surgery for Relapsed Ovarian Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2021 Dec 2;385(23):2123–31.
 33. Chiang YC, Lin PH, Cheng WF. Homologous Recombination Deficiency Assays in Epithelial Ovarian Cancer: Current Status and Future Direction. Vol. 11, *Frontiers in Oncology*. Frontiers Media S.A.; 2021.
 34. Whelan DR, Lee WTC, Yin Y, Ofri DM, Bermudez-Hernandez K, Keegan S, et al. Spatiotemporal dynamics of homologous recombination repair at single collapsed replication forks. *Nat Commun*. 2018 Dec 1;9(1).
 35. Miller RE, Leary A, Scott CL, Serra V, Lord CJ, Bowtell D, et al. ESMO recommendations on predictive biomarker testing for homologous recombination deficiency and PARP inhibitor benefit in ovarian cancer. *Annals of Oncology*. 2020 Dec 1;31(12):1606–22.
 36. Pujade-Lauraine E, Ledermann JA, Selle F, GebSKI V, Penson RT, Oza AM, et al. Olaparib tablets as maintenance therapy in patients with platinum-sensitive,

- relapsed ovarian cancer and a BRCA1/2 mutation (SOLO2/ENGOT-Ov21): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2017 Sep 1;18(9):1274–84.
37. Mirza MR, Monk BJ, Herrstedt J, Oza AM, Mahner S, Redondo A, et al. Niraparib Maintenance Therapy in Platinum-Sensitive, Recurrent Ovarian Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2016 Dec;375(22):2154–64.
 38. Coleman RL, Oza AM, Lorusso D, Aghajanian C, Oaknin A, Dean A, et al. Rucaparib maintenance treatment for recurrent ovarian carcinoma after response to platinum therapy (ARIEL3): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet*. 2017 Oct 28;390(10106):1949–61.
 39. Disilvestro P, Banerjee S, Colombo ; Nicoletta, Scambia G, Kim BG, Oaknin A, et al. Overall Survival With Maintenance Olaparib at a 7-Year Follow-Up in Patients With Newly Diagnosed Advanced Ovarian Cancer and a BRCA Mutation: The SOLO1/GOG 3004 Trial. *J Clin Oncol* [Internet]. 2022;41:609–17. Available from: <https://doi.org/10.1200/JCO.2021.41.17.3611>.
 40. González-Martín A, Pothuri B, Vergote I, DePont Christensen R, Graybill W, Mirza MR, et al. Niraparib in Patients with Newly Diagnosed Advanced Ovarian Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2019 Dec 19;381(25):2391–402.
 41. Monk BJ, Parkinson C, Cheol Lim M, O DM, Oaknin A, Wilson MK, et al. A Randomized, Phase III Trial to Evaluate Rucaparib Monotherapy as Maintenance Treatment in Patients With Newly Diagnosed Ovarian Cancer (ATHENA-MONO/GOG-3020/ ENGOT-ov45) [Internet]. Vol. 40, *J Clin Oncol*. 2022. Available from: <https://doi.org/10.1200/JCO.2021.40.17.3611>.
 42. Ray-Coquard I, Pautier P, Pignata S, Pérol D, González-Martín A, Berger R, et al. Olaparib plus Bevacizumab as First-Line Maintenance in Ovarian Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2019 Dec 19;381(25):2416–28.
 43. Rebbeck TR, Mitra N, Wan F, Sinilnikova OM, Healey S, McGuffog L, et al. Association of type and location of BRCA1 and BRCA2 mutations with risk of breast and ovarian cancer. *JAMA - Journal of the American Medical Association*. 2015 Apr 7;313(13):1347–61.
 44. Wang Y, Bernhardt AJ, Cruz C, Krais JJ, Nacson J, Nicolas E, et al. The BRCA1-Δ11q alternative splice isoform bypasses germline mutations and promotes therapeutic resistance to PARP inhibition and cisplatin. *Cancer Res*. 2016 May 1;76(9):2778–90.
 45. Labidi-Galy SI, Olivier T, Rodrigues M, Ferraioli D, Derbel O, Bodmer A, et al. Location of mutation in BRCA2 gene and survival in patients with ovarian cancer. *Clinical Cancer Research*. 2018 Jan 15;24(2):326–33.
 46. Drost R, Bouwman P, Rottenberg S, Boon U, Schut E, Klarenbeek S, et al. BRCA1 RING function is essential for tumor suppression but dispensable for therapy resistance. *Cancer Cell*. 2011;20(6):797–809.
 47. Drost R, Dhillon KK, Van Der Gulden H, Van Der Heijden I, Brandsma I, Cruz C, et al. BRCA1185delAG tumors may acquire therapy resistance through expression of RING-less BRCA1. *Journal of Clinical Investigation*. 2016 Aug 1;126(8):2903–18.

48. Paul MW, Sidhu A, Liang Y, van Rossum-Fikkert SE, Odijk H, Zelensky AN, et al. Role of brca2 dna-binding and c-terminal domain in its mobility and conformation in dna repair. *Elife*. 2021 Jul 1;10.
49. Edwards SL, Brough R, Lord CJ, Natrajan R, Vatcheva R, Levine DA, et al. Resistance to therapy caused by intragenic deletion in BRCA2. *Nature*. 2008 Feb 28;451(7182):1111–5.
50. Lheureux S, Lai Z, Dougherty BA, Runswick S, Hodgson DR, Timms KM, et al. Long-term responders on olaparib maintenance in high-grade serous ovarian cancer: Clinical and molecular characterization. *Clinical Cancer Research*. 2017 Aug 1;23(15):4086–94.
51. Coyne GO, Karlovich C, Wilsker D, Voth AR, Parchment RE, Chen AP, et al. PARP Inhibitor Applicability: Detailed Assays for Homologous Recombination Repair Pathway Components. Vol. 15, *OncoTargets and Therapy*. Dove Medical Press Ltd; 2022. p. 165–80.
52. Fda. List of Cleared or Approved Companion Diagnostic Devices (In Vitro and Imaging Tools).
53. Biallelic Deletion of PALB2 Occurs Across Multiple Tumor Types and Suggests Responsiveness to Poly (ADP-ribose) Polymerase Inhibition Background [Internet]. 2017. Available from: www.cbioportal.org
54. Mateo J, Porta N, Bianchini D, McGovern U, Elliott T, Jones R, et al. Olaparib in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer with DNA repair gene aberrations (TOPARP-B): a multicentre, open-label, randomised, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2020 Jan 1;21(1):162–74.
55. Reiss KA, Mick R, O'hara MH, Teitelbaum U, Karasic TB, Schneider C, et al. Phase II Study of Maintenance Rucaparib in Patients With Platinum-Sensitive Advanced Pancreatic Cancer and a Pathogenic Germline or Somatic Variant in BRCA1, BRCA2, or PALB2 [Internet]. Vol. 39, *J Clin Oncol*. 2021. Available from: <https://doi.org/10.1200/JCO.2021.39.1000>
56. Swisher EM, Kwan TT, Oza AM, Tinker A V., Ray-Coquard I, Oaknin A, et al. Molecular and clinical determinants of response and resistance to rucaparib for recurrent ovarian cancer treatment in ARIEL2 (Parts 1 and 2). *Nat Commun*. 2021 Dec 1;12(1).
57. van Wilpe S, Tolmeijer SH, Koornstra RHT, de Vries IJM, Gerritsen WR, Ligtenberg M, et al. Homologous recombination repair deficiency and implications for tumor immunogenicity. Vol. 13, *Cancers*. MDPI; 2021.
58. Melinda LT, Kirsten MT, Julia R, Bryan H, Gordon BM, Kristin CJ, et al. Homologous recombination deficiency (hrd) score predicts response to platinum-containing neoadjuvant chemotherapy in patients with triple-negative breast cancer. *Clinical Cancer Research*. 2016 Aug 1;22(15):3764–73.
59. Davies H, Glodzik D, Morganella S, Yates LR, Staaf J, Zou X, et al. HRDetect is a predictor of BRCA1 and BRCA2 deficiency based on mutational signatures. *Nat Med*. 2017 Apr 1;23(4):517–25.

60. Nguyen L, W. M. Martens J, Van Hoeck A, Cuppen E. Pan-cancer landscape of homologous recombination deficiency. *Nat Commun.* 2020 Dec 1;11(1).
61. Gulhan DC, Lee JJK, Melloni GEM, Cortés-Ciriano I, Park PJ. Detecting the mutational signature of homologous recombination deficiency in clinical samples. *Nat Genet.* 2019 May 1;51(5):912–9.
62. Wolf DM, Yau C, Sanil A, Glas A, Petricoin E, Wulfkuhle J, et al. DNA repair deficiency biomarkers and the 70-gene ultra-high risk signature as predictors of veliparib/carboplatin response in the I-SPY 2 breast cancer trial. *NPJ Breast Cancer.* 2017;3(1).
63. Graeser M, McCarthy A, Lord CJ, Savage K, Hills M, Salter J, et al. A marker of homologous recombination predicts pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy in primary breast cancer. *Clinical Cancer Research.* 2010 Dec 15;16(24):6159–68.
64. Castroviejo-Bermejo M, Cruz C, Llop-Guevara A, Gutiérrez-Enríquez S, Ducy M, Ibrahim YH, et al. A RAD 51 assay feasible in routine tumor samples calls PARP inhibitor response beyond BRCA mutation . *EMBO Mol Med.* 2018 Dec;10(12).
65. Wilsker DF, Barrett AM, Dull AB, Lawrence SM, Hollingshead MG, Chen A, et al. Evaluation of pharmacodynamic responses to cancer therapeutic agents using DNA damage markers. *Clinical Cancer Research.* 2019;25(10):3084–95.
66. Chopra N, Tovey H, Pearson A, Cutts R, Toms C, Proszek P, et al. Homologous recombination DNA repair deficiency and PARP inhibition activity in primary triple negative breast cancer. *Nat Commun.* 2020 Dec 1;11(1).
67. Zellweger R, Dalcher D, Mutreja K, Berti M, Schmid JA, Herrador R, et al. Rad51-mediated replication fork reversal is a global response to genotoxic treatments in human cells. *Journal of Cell Biology.* 2015;208(5):563–79.
68. Murai J, Feng Y, Yu GK, Ru Y, Tang SW, Shen Y, et al. Resistance to PARP inhibitors by SLFN11 inactivation can be overcome by ATR inhibition [Internet]. Vol. 7. Available from: www.impactjournals.com/oncotarget
69. Berti M, Teloni F, Mijic S, Ursich S, Fuchs J, Palumbieri MD, et al. Sequential role of RAD51 paralog complexes in replication fork remodeling and restart. *Nat Commun.* 2020 Dec 1;11(1).
70. Le Page C, Amuzu S, Rahimi K, Gotlieb W, Ragoussis J, Tonin PN. Lessons learned from understanding chemotherapy resistance in epithelial tubo-ovarian carcinoma from BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Semin Cancer Biol.* 2021 Dec 1;77:110–26.
71. Sakai W, Swisher EM, Karlan BY, Agarwal MK, Higgins J, Friedman C, et al. Secondary mutations as a mechanism of cisplatin resistance in BRCA2-mutated cancers. *Nature.* 2008 Feb 28;451(7182):1116–20.
72. Kondrashova O, Nguyen M, Shield-Artin K, Tinker A V., Teng NNH, Harrell MI, et al. Secondary somatic mutations restoring RAD51C and RAD51D associated with acquired resistance to the PARP inhibitor rucaparib in high-grade ovarian carcinoma. *Cancer Discov.* 2017 Sep 1;7(9):984–98.

73. Pettitt SJ, Frankum JR, Punta M, Lise S, Alexander J, Chen Y, et al. Clinical brca1/2 reversion analysis identifies hotspot mutations and predicted neoantigens associated with therapy resistance. *Cancer Discov.* 2020 Oct 1;10(10):1475–88.
74. Vaidyanathan A, Sawers L, Gannon AL, Chakravarty P, Scott AL, Bray SE, et al. ABCB1 (MDR1) induction defines a common resistance mechanism in paclitaxel- and olaparib-resistant ovarian cancer cells. *Br J Cancer.* 2016 Aug 9;115(4):431–41.
75. Murai J, Huang SYN, Das BB, Renaud A, Zhang Y, Doroshow JH, et al. Trapping of PARP1 and PARP2 by clinical PARP inhibitors. *Cancer Res.* 2012 Nov 1;72(21):5588–99.
76. Makvandi M, Pantel A, Schwartz L, Schubert E, Xu K, Hsieh CJ, et al. A PET imaging agent for evaluating PARP-1 expression in ovarian cancer. *Journal of Clinical Investigation.* 2018 May 1;128(5):2116–26.
77. Thomas A, Murai J, Pommier Y. The evolving landscape of predictive biomarkers of response to PARP inhibitors. Vol. 128, *Journal of Clinical Investigation.* American Society for Clinical Investigation; 2018. p. 1727–30.
78. Bouwman P, Aly A, Escandell JM, Pieterse M, Bartkova J, Van Der Gulden H, et al. 53BP1 loss rescues BRCA1 deficiency and is associated with triple-negative and BRCA-mutated breast cancers. *Nat Struct Mol Biol.* 2010;17(6):688–95.
79. Bunting SF, Callén E, Kozak ML, Kim JM, Wong N, López-Contreras AJ, et al. BRCA1 Functions Independently of Homologous Recombination in DNA Interstrand Crosslink Repair. *Mol Cell.* 2012 Apr 27;46(2):125–35.
80. Lord CJ, Ashworth A. Mechanisms of resistance to therapies targeting BRCA-mutant cancers. Vol. 19, *Nature Medicine.* 2013. p. 1381–8.
81. Xu G, Ross Chapman J, Brandsma I, Yuan J, Mistrik M, Bouwman P, et al. REV7 counteracts DNA double-strand break resection and affects PARP inhibition. *Nature.* 2015 May 28;521(7553):541–4.
82. McCormick A, Donoghue P, Dixon M, O’Sullivan R, O’Donnell RL, Murray J, et al. Ovarian cancers harbor defects in nonhomologous end joining resulting in resistance to rucaparib. *Clinical Cancer Research.* 2017 Apr 15;23(8):2050–60.
83. AlHilli MM, Becker MA, Weroha SJ, Flatten KS, Hurley RM, Harrell MI, et al. In vivo anti-tumor activity of the PARP inhibitor niraparib in homologous recombination deficient and proficient ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol.* 2016 Nov 1;143(2):379–88.
84. Jiang X, Li X, Li W, Bai H, Zhang Z. PARP inhibitors in ovarian cancer: Sensitivity prediction and resistance mechanisms. Vol. 23, *Journal of Cellular and Molecular Medicine.* Blackwell Publishing Inc.; 2019. p. 2303–13.
85. Choi YE, Battelli C, Watson J, Liu J, Curtis J, Morse AN, et al. Sublethal concentrations of 17-AAG suppress homologous recombination DNA repair and enhance sensitivity to carboplatin and olaparib in HR proficient ovarian cancer cells [Internet]. Available from: www.impactjournals.com/oncotarget/

86. Labidi-Galy SI, Rodrigues M, Sandoval JL, Kurtz JE, Heitz F, Mosconi AM, et al. Association of location of BRCA1 and BRCA2 mutations with benefit from olaparib and bevacizumab maintenance in high-grade ovarian cancer: phase III PAOLA-1/ENGOT-ov25 trial subgroup exploratory analysis. *Annals of Oncology*. 2023 Feb 1;34(2):152–62.