



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA

Università degli Studi di Padova

**Dipartimento di Farmacologia ed Anestesiologia**

**SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE  
FARMACOLOGICHE  
INDIRIZZO IN FARMACOLOGIA, TOSSICOLOGIA E  
TERAPIA  
CICLO XXIII**

**Ruolo della Farmacogenetica  
nello Sviluppo della Diagnostica  
Associata al Trattamento  
Farmacologico**

**Direttore della Scuola :** Ch.mo Prof. Rosa Maria Gaion

**Coordinatore d'indirizzo:** Ch.mo Prof. Pietro Palatini

**Supervisore:** Ch.mo Prof. Rosa Maria Gaion

**Dottorando :** Dott. Dino Paladin



## **Abstract**

Le ricerche svolte in questo lavoro riguardano l'analisi delle applicazioni della farmacogenetica relative alla somministrazione dei farmaci Abacavir, Cetuximab e Panitumumab con lo sviluppo di sistemi diagnostici utilizzando metodiche di biologia molecolare (PCR, RFLP, sequenziamento). Sono stati sviluppati due kit diagnostici con marcatura CE IVD per la determinazione del genotipo HLA-B\*57:01 e delle mutazioni del codone 12 e 13 del gene K-RAS.



## Riassunto

L'attenzione e la sensibilizzazione nei confronti di aspetti legati alla farmacogenetica, assieme alla ricerca di elementi che possano aiutare ad identificare i meccanismi molecolari alla base di reazioni avverse ai farmaci, sono in costante crescita. Per alcuni farmaci è già noto il legame tra tollerabilità e/o funzionalità ed alcune caratteristiche genetiche individuali. Fra questi un esempio è dato da Abacavir, una guanosina, inibitore nucleosidico della trascrittasi inversa, approvato per il trattamento dell'HIV in combinazione con altri antiretrovirali. Abacavir è il primo farmaco su cui è stato effettuato un percorso di studi che ha portato all'individuazione di un test farmacogenetico che le Autorità Regolatorie hanno indicato come obbligatorio prima della somministrazione.

È stato infatti dimostrato che l'allele HLA-B\*57:01 in pazienti HIV+ ha un significato altamente predittivo per l'individuazione dei soggetti ipersensibili.

Il locus di suscettibilità risiede specificamente nell'aplotipo ancestrale 57.1 identificato, oltre che da B\*57:01, da DRB1\*0701 e DQB1\*0303. Proprio in virtù di questo ormai ben accertato valore predittivo, nell'iter terapeutico di tutti i pazienti diagnosticati come HIV+ è preliminarmente raccomandata la ricerca dell'allele HLA B\*57:01. La reazione di ipersensibilità ad Abacavir è caratterizzata da febbre, rash e una combinazione di altri sintomi come mal di testa e sintomi gastrointestinali, che tipicamente insorgono nelle prime 6 settimane dall'inizio della terapia. Oggi grazie all'introduzione del test farmacogenetico sono stati drasticamente ridotti i casi di ipersensibilità e reazioni avverse al farmaco. Ciò è ben documentato anche dai risultati dello studio prospettico randomizzato, PREDICT 1, che ha coinvolto 265 centri ospedalieri (di cui 38 in Italia) per un totale di 1956 pazienti. I partecipanti sono stati randomizzati in cieco in due gruppi di confronto: il gruppo di "Screening HLA-B\*57:01" in cui i pazienti eseguivano il test di tipizzazione HLA-B\*57:01 ed assumevano il farmaco solo se quest'ultimo era negativo, ed il gruppo di controllo "Gestione clinica standard" in cui i pazienti assumevano il farmaco come parte della loro terapia senza essere stati preventivamente sottoposti al test.

I risultati dello studio hanno dimostrato che lo screening HLA-B\*57:01 annulla le reazioni di ipersensibilità diagnosticate clinicamente e confermate con patch test e riduce a meno del 50% le reazioni di ipersensibilità diagnosticate con solo criterio clinico (Mallal S. et al. 2008).

Per verificare la presenza dell'allele HLA-B\*57:01 vengono condotte quattro PCR-SSP, di cui tre finalizzate a rilevare la presenza di alleli B\*57 correlati ed una rivolta all'identificazione di uno SNP (rs 2395029) presente nel gene della proteina HCP 5, in forte linkage disequilibrium con B\*57:01.

La positività alle tre PCR-SSP per l'allele HLA-B\*57:01 potrebbe essere ottenuta anche in presenza di altri alleli più rari del gruppo B\*57, nonché dagli alleli B\*55:14 e B\*58:14 (che condividono un'altissima omologia di sequenza e che vengono di seguito definiti "alleli HLA B\*57:01 correlati"). In questo caso la presenza dell'allele HLA-B\*57:01 sarà esclusa per la negatività dell'amplificazione dello SNP rs 2395029 (Colombo S. et al., 2008) ed il campione sarà da intendersi positivo per un allele HLA B\*57:01 correlato.

Recenti studi di Chessman e colleghi, volti a identificare le ragioni molecolari per cui l'allele HLA-B\*57:01 scatena la sindrome di ipersensibilità ad Abacavir, ne hanno focalizzato la causa nella particolare conformazione strutturale del sito di legame delle molecole MHC-I, che legerebbero con elevata affinità neo-autoantigeni derivati dalla coniugazione del farmaco con uno o più peptidi self, innescando la reazione immunitaria da parte delle cellule T. Gli esperimenti condotti hanno escluso il verificarsi di tale meccanismo in presenza di aplotipi HLA B\*57:02 e B\*57:03 ma non per gli altri più rari alleli HLA B\*57:01 correlati. Per tale motivo si ritiene cautelativo, ai fini della somministrazione del farmaco, considerare non idoneo un paziente che risulti comunque positivo per un allele HLA-B\*57:01 correlato. Le quattro amplificazioni previste sono organizzate in due PCR multiplex.

Inoltre, è noto da tempo che alterazioni genetiche multiple contribuiscono allo sviluppo della maggior parte dei tumori. Tali mutazioni sono per lo più somatiche; mutazioni della linea germinale sono più rare e riguardano meno dell'1% di tutti i tumori umani. Tra tutti i geni tumore-correlati, quelli della famiglia ras sono ben

caratterizzati. Harvey-ras (H-ras), Kirsten-ras (K-ras) e N-ras (perché trovato in forma attiva in Neuroblastoma) sono i tre geni funzionali di questa famiglia. Codificano per proteine di 21 Kd che svolgono un ruolo importante nella trasduzione del segnale e nella proliferazione cellulare; sono localizzate nel versante interno della membrana cellulare ed espresse ubiquitariamente; appartengono alla famiglia delle proteine G e come tali legano ad alta affinità e specificità il GTP e il GDP e inoltre possiedono attività GTPasica: passano da uno stato attivo legato al GTP ad uno inattivo legato al GDP. E' stato dimostrato, in vari tipi di tumori sporadici umani, che le proteine RAS (p21RAS) possono acquisire potere trasformante in seguito a mutazioni puntiformi nei rispettivi geni. Tali mutazioni diminuiscono l'attività GTPasica della proteina RAS e aumentano il tasso di scambio del GDP a GTP e quindi della p21RAS attiva, forma in cui la crescita e la differenziazione cellulare sono stimolate in modo autonomo. Tra i geni della famiglia ras, K-ras è quello che si riscontra mutato negli stadi più precoci dello sviluppo di certi tipi di tumore, quindi le mutazioni in oggetto possiedono le caratteristiche per fungere da utili biomarcatori nella diagnosi precoce e nella prevenzione di tali patologie tumorali. Le mutazioni del gene K-ras sono comuni e ben caratterizzate nel carcinoma del pancreas, del colon e del polmone, tumori che provocano il più grande numero di decessi in tutto il mondo. Nel gene sono stati caratterizzati tre hot spot al codone 12, 13 e 61: la frequenza di mutazioni a livello dei 3 codoni rispetta le seguenti percentuali: 70-75% a carico del codone 12, 20-25% a carico del codone 13 and < 5 % a carico del codone 61. La più alta incidenza riguarda l'adenocarcinoma del pancreas in cui la mutazione specifica è evidenziabile in quasi il 90% dei campioni analizzati. La stessa mutazione è stata descritta in circa il 40% dei casi di adenocarcinoma del colon, in circa il 30% di quelli del polmone e in circa il 50% dei carcinomi follicolari tiroidei. Il meeting del 2008 dell'ASCO (American Society of Clinical Oncology) ha presentato evidenze per cui pazienti con tumori al colon in stadio avanzato non avrebbero alcun beneficio dalla somministrazione di cetuximab (Erbix) e panitumumab (Vectibix), se mutati per il gene k-ras. Lo stato mutazionale di k-ras è quindi un marcatore predittivo per la risposta alla terapia anti tumorale. Diversi metodi basati

sull'amplificazione genica sono stati finora utilizzati per la ricerca di mutazioni nel gene K-ras.

Poiché le mutazioni sia al codone 12 che al codone 13 eliminano un sito di restrizione specifico, possono essere facilmente dimostrate a livello molecolare mediante amplificazione della regione di interesse e successiva digestione con un enzima di restrizione specifico (RFLP). Il risultato dello studio è la realizzazione di un kit diagnostico per l'identificazione delle mutazioni a livello del codone 12 e 13 dell'oncogene k-ras, mediante amplificazione del DNA e RFLP. L'approccio molecolare adottato per lo studio delle mutazioni del codone 12 e 13 del gene K-ras consiste in un'amplificazione del DNA, preventivamente estratto, con primer fiancheggianti la sequenza nucleotidica di interesse, seguita da una digestione enzimatica (RFLP) per la tipizzazione della mutazione. Poiché le mutazioni al codone 12 e 13 eliminano entrambe un sito di restrizione, possono essere facilmente dimostrate a livello molecolare mediante digestione dell'amplificato con un enzima di restrizione specifico e successiva elettroforesi su gel di agarosio ad alta risoluzione. La presenza della mutazione può così essere identificata in base al peso molecolare delle bande prodotte dalla digestione.

Una prospettiva futura è quella di sviluppare un sistema per la determinazione dello stato mutazionale dei codoni 12 e 13 dell'esone 2 di K-ras, mediante ARMS Real Time PCR. Studi preliminari di sensibilità analitica per le mutazioni G12D e G12V (le più frequenti a livello del codone 12) dimostrano una sensibilità del sistema pari all'1.25%, analizzando i risultati sia mediante calcolo del  $\Delta C_t$  sia mediante analisi del profilo di dissociazione.

## Summary

### **The Role of Pharmacogenetics in the Development of Diagnostics Associated with Pharmacological Treatment**

Recently, there has been a growing focus and awareness on pharmacogenetic aspects, backed by research of the elements that help identify the molecular mechanisms underlying the adverse reactions to drugs. The relation between the tolerance and/or functionality, and the individual genetic characteristics is already known for certain drugs. One of these drugs is Abacavir, a guanosine, nucleoside inhibitor of the reverse transcriptase, approved for the HIV treatment in combination with other antiretroviral drugs. Abacavir was the first drug subjected to a study plan that aimed to the identification of a pharmacogenetic test, now indicated as mandatory by the Regulatory Authorities before Abacavir administration. It was shown that the HLA-B\*57:01 allele in HIV+ patients has a highly predictive value for the identification of the Abacavir hypersensitive subjects. The susceptibility locus is characterized by the ancestral haplotype 57.1, that is determined by the DRB1\*0701 and DQB1\*0303 alleles, besides the B\*57:01 one.

In virtue of this well affirmed predictive value, the preliminary testing for HLA B\*57:01 allele is recommended for all of the HIV+ patients. The Abacavir hypersensitivity reaction involves fever, rash and a combination of other symptoms, such as headache and gastrointestinal symptoms that usually occur within the first 6 weeks of the treatment. Today, the number of drug hypersensitivity and adverse reaction cases has been significantly reduced, thanks to the introduction of pharmacogenetic tests. These facts are supported by the results of the prospective randomized study, PREDICT 1, that involved 265 hospital centers (of which 38 are Italian) and 1956 patients, in total. The participants were blindly randomized in two comparison groups: the "Screening HLA-B\*57:01" group in which HLA-B\*57:01 testing was performed on patients, and the drug was administered only if the test was negative, and the "Standard Clinical Management" group in which the patients underwent the drug administration as a part of their therapy without prior testing.

The results of this study show that the HLA-B\*57:01 screening abolishes the clinically diagnosed and patch-test confirmed hypersensitivity reactions, and that it reduces the hypersensitivity reactions diagnosed with only the clinical criteria by 50% (Mallal S. et al. 2008).

In order to determine the presence of the HLA-B\*5701 allele, four PCR-SSP reactions are performed, three of which are aimed to detect the presence of the B\*57 related alleles, while one is used for the identification of a SNP (rs2395029) located on the HCP 5 gene, that is in strong linkage disequilibrium with the B\*5701 allele. Other rare alleles of the B\*57 group, such as the alleles B\*5514 and B\*5814 (share a sequence of high similarity and are therefore defined "HLA B\*5701 correlated alleles"), may yield a positive result in the three PCR-SSP reactions used for the HLA-B\*5701. Nevertheless, in this case the presence of the HLA B\*5701 allele will be excluded due to the negative result of the SNP rs2395029 amplification (Colombo S. et al., 2008). Recent studies by Chessman and colleagues to identify the molecular reasons why the HLA-B\*57:01 causes the hypersensitivity syndrome by Abacavir, have focalized in particular on the structural conformation of the binding site of the MHC-1 molecule, which would bind with high affinity neo-autoantigens derived from the conjugation of the drug with one or more self peptides, resulting in the immune response of the T cells. The experiments conducted have excluded this mechanism in the presence of haplotypes HLA B\*57:02 and B\*57:03, but not for the other more rare HLA B\*57:01 correlated alleles. The four amplifications are organized into two multiplex PCR. Further, it is known that multiple genetic alterations can contribute to the development of most cancers. These mutations are mostly somatic; mutations of the germinal line are rare and involve less than 1% of all human cancers. Among the gene-related cancers, the *ras* family ones are very well characterized. *Harvey-ras* (*H-ras*), *Kirsten-ras* (*K-ras*) and *N-ras* (found in the active form of neuroblastoma) are the three functional genes of this family. They code for 21 KDa proteins that have important roles in signal transduction and cell proliferation; they are located in the inner side of the cell membrane and ubiquitously expressed. They belong to the G-protein family since they link with high affinity and specificity to GTP and GDP and show

GTPase activity: they switch from the GDP-linked inactive state to the GTP-linked active state. It was demonstrated in several kinds of human cancers that the RAS proteins (p21RAS) can acquire transforming power as a consequence of point-mutations in their respective genes. These mutations decrease the GTPase activity of the RAS protein and increase the GTP to GDP reaction rate, so the active form of p21RAS that is the form that stimulates growth and cell differentiation. Among the *ras* gene family, the mutated K-ras gene is found in the earliest stages of the development of some cancers; therefore, these mutations can be biomarkers for early diagnosis and prevention of that cancer diseases. *K-ras* gene mutations are common and well characterized in pancreas, colon and lung carcinomas that are responsible for the greatest number of cancer deaths worldwide. Three hot spots in the K-ras gene at codon 12, 13, and 61 have been characterized. The frequency of mutations at the level of the 3 codons is the following in percentages: 70-75% in codon 12, 20-25% in codon 13, and < 5 % in codon 61. The highest incidence has been found in pancreas adenocarcinoma, in which the specific mutation is detectable in about 90% of the analyzed samples. The same mutation was described in 40% of colon adenocarcinomas, in 30% of lung and 50% of follicular thyroid adenocarcinomas. During the American Society of Clinical Oncology (ASCO) in 2008, evidence was presented in which patients with colon tumors in advanced stages would not receive any benefit from the administration of cetuximab (Erbix) and panitumumab (Vectibix), if there were mutations in the k-ras gene. The k-ras mutational state is thus a predictive marker for the antitumor therapy. Several methods based on gene amplification have been used for the detection of mutations in the *K-ras* gene. Since the mutations at codon 12 results in a specific restriction site deletion, they can be easily demonstrated at the molecular level by amplification of the region of interest followed by digestion with a specific restriction enzyme and RFLP analysis. The detection of mutations of the codon 12 and 13 in the k-ras oncogene is done by amplification of DNA and RFLP. The molecular strategy adopted in this kit for detection of mutations at the codon 12 and 13 of the *K-ras* gene consists in amplification of previously extracted DNA with specific primers flanking the region of interest, followed by an

enzymatic digestion (RFLP) for typing the mutation. The mutations at codon 12 and 13 cause a restriction site deletion that can be easily demonstrated at the molecular level by digestion with a specific restriction enzyme followed by high resolution agarose gel electrophoresis. The mutation can be identified by restriction fragments size analysis (electrophoretic pattern).

In the near future, a new system will be developed to determine the state of mutations in codon 12 and 13 of exon 2 of the K-ras, by ARMS Real time PCR. Preliminary analytical sensitivity studies for the mutations G12D and G12V (the most frequent in codon 12) show a sensitivity of the system to be 1.25% after analyzing the results by calculating the  $\Delta C_t$  and the dissociation profile.

## Sommario

1	Introduzione.....	1
1.1	Il tumore al colon retto.....	1
1.2	Epidemiologia.....	1
1.3	Carcinogenesi.....	5
1.3.1	K-RAS.....	8
1.4	Terapia per il tumore colon-rettale metastatico.....	12
1.5	Inibitori dell'EGFR come terapia per il cancro metastatico colon rettale.....	16
1.5.1	Cetuximab / Erbitux.....	18
1.5.1.1	Meccanismo d'azione.....	19
1.5.1.2	Trials clinici.....	20
1.5.1.3	Cetuximab in monoterapia.....	20
1.5.1.4	Cetuximab in combinazione con altre terapie.....	22
1.5.2	Panitumumab / Vectibix.....	25
1.5.2.1	Meccanismo d'azione.....	26
1.5.2.2	Trials clinici.....	28
1.5.3	Markers predittivi.....	32
1.6	Farmacogenetica.....	34
1.6.1	Sviluppi della farmacogenetica.....	38
1.6.1.1	Abacavir e Allele HLA-B*5701.....	39
1.6.1.2	Warfarin e polimorfismi dei geni VKOR e CYP2C9.....	40
1.6.1.3	Farmaci tiopurinici e TPTM (Tiopurina S-metiltransferasi).....	42
1.6.1.4	Tamoxifene e Varianti Alleliche del gene CYP2D6.....	44
1.6.1.5	Farmaci e Varianti alleliche del gene CYP2C19.....	46
1.7	Tecniche diagnostiche.....	48
1.7.1	Metodi di screening diretti.....	49
a.	Sequenziamento.....	49
b.	Il Pyrosequencing.....	50
c.	Amplification Refractory Mutation System (ARMS).....	53
d.	Combined Real Time Polymerase Chain Reaction and ARMS.....	53
e.	Metodica "Reverse Dot Blot".....	56

1.7.2	Metodi di screening indiretti .....	57
a.	High Resolution Melting (HRM) .....	57
b.	Analisi Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) .....	58
c.	Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) .....	59
1.7.2.1	Metodi di screening ad alta sensibilità.....	62
a.	Fluorescent Amplicon Generation Assay .....	63
b.	Polymerase Chain Reaction arricchita per la sequenza mutata .....	64
2	Materiali e Metodi.....	66
2.1	Selezione del campione .....	66
2.2	Raccolta, manipolazione e pretrattamento del campione .....	67
2.3	Estrazione e Conservazione del DNA.....	68
2.4	Progettazione dei primers.....	71
2.5	Amplificazione di sequenze specifiche di DNA mediante PCR ( <i>Polimerase Chain Reaction</i> ) .....	72
2.6	Elettroforesi in gel di agarosio .....	75
2.7	Ligazione .....	78
2.8	Trasformazione batterica .....	79
2.9	Colture di batteri.....	79
2.10	Screening delle colonie.....	79
2.11	Estrazione del DNA Plasmidico .....	80
2.12	Quantificazione del DNA .....	81
2.13	Digestione degli amplificati.....	81
2.14	Sequenziamento del DNA .....	83
3	Risultati.....	86
3.1	Gene K-RAS .....	86
3.2	Clonaggio .....	86
3.3	Prove di sensibilità della reazione di PCR.....	88
3.4	Digestione enzimatica degli amplificati.....	89
3.5	Validazione esterna.....	91
3.6	Gene HLA .....	93
3.7	Risultati delle reazioni di PCR-SSP.....	94

4	Discussioni e Conclusioni.....	100
4.1	Kit GENEQUALITY 12-13-K-RAS .....	100
4.2	Kit GENEQUALITY HLA-B*57:01 .....	105
	Bibliografia .....	107



# 1 Introduzione

## 1.1 Il tumore al colon retto

La definizione tumore colon rettale comprende i tumori del colon, della giunzione retto/sigmoidea, del retto, dell'ano e del canale anale (ICD-10 C18, C19, C20, C21, secondo la decima revisione della classificazione internazionale delle malattie).

L'eziologia della malattia è piuttosto complessa ed è dovuta all'interazione di fattori ambientali, genetici e condizioni patologiche predisponenti. I fattori genetici non implicano una



causalità diretta ma determinano una maggiore

*Figura 1: visualizzazione anatomica di stomaco, intestino tenue ed intestino crasso.*

suscettibilità e quindi un maggior rischio di sviluppare il tumore rispetto alla popolazione normale (Wei et al., 2010).

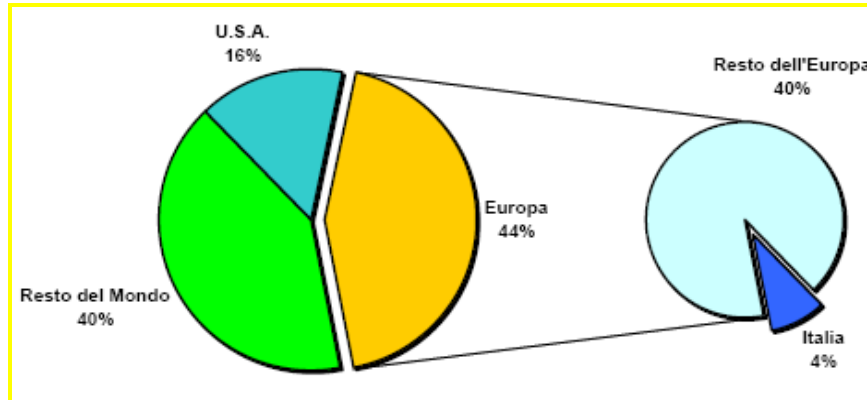
## 1.2 Epidemiologia

Il tumore al colon retto rappresenta ad oggi un problema sanitario di primo piano a livello mondiale con un'incidenza particolarmente elevata nei paesi maggiormente sviluppati, in Nord America, Europa

nord-occidentale e Oceania. L'incidenza del CCR, infatti, cambia significativamente tra i Paesi industrializzati e quelli in via di sviluppo, con un rapporto di 4:1 a sfavore dei primi (Karsa et al., 2010). Non bisogna comunque dimenticare che da vent'anni a questa parte si sta osservando un'inversione di tendenza tale per cui nei Paesi considerati ad alto rischio, l'incidenza si è stabilizzata, con una riduzione del 20% della mortalità, mentre nei Paesi a basso rischio si sta assistendo ad un graduale aumento dei casi. Le ragioni delle variazioni geografiche ed etniche dell'incidenza di questo tumore sono da ricercare nelle differenze dello stile di vita e dell'alimentazione tra Paesi Occidentali e quelli in via di sviluppo e, in ultima analisi, anche nelle diverse possibilità di trattamento di screening di questa neoplasia.

In generale tuttavia, l'incidenza del tumore del colon retto è in aumento in tutto il mondo (945.000 ammalati l'anno) con una mortalità stimata intorno ai 450.000 decessi l'anno; dati relativi al 2006 stimano l'incidenza del cancro colon rettale in Europa attorno al 12,9%, distinguendo per i due sessi (12,8% nella popolazione maschile e 13,1% nella popolazione femminile), pari a 412.900 nuovi casi/anno, mentre nel 2009 negli Stati Uniti sono stati diagnosticati 146.970 nuovi casi (Rozen et al., 2011). In Italia i dati epidemiologici riportati dall'AIRTUM (associazione italiana registro tumori) per il periodo 2003-2005 lo collocano al terzo posto fra i tumori più frequentemente diagnosticati nella donna (11,9%) e al quarto

nell'uomo (12%) con circa 40.000 nuovi casi/anno e il Registro Tumori Veneto stima che solo in questa regione ne vengano diagnosticati ogni anno circa 3350 nuovi casi (70,2% a carico del colon) ripartiti quasi equamente fra uomini e donne.



*Figura 2: percentuali di incidenza del CCR nel mondo (2009).*

Nel nostro Paese esiste una certa variabilità geografica nell'incidenza di tale tipo di tumore con un rapporto fra le aree con i tassi più alti (centro-nord) e quelle con i più bassi (Italia meridionale e insulare) di circa 2:1 sia fra gli uomini che fra le donne.

L'andamento dell'incidenza del CCR rispetto all'età segue la curva tipica della maggioranza delle neoplasie con un incremento delle diagnosi proporzionale all'aumentare dell'età; infatti, le diagnosi sono sporadiche nelle età giovanili, si attestano a circa 50 casi ogni 100.000 abitanti/anno fra i 30 e i 50 anni e aumentano a 250 fra i 50 e gli 80 anni.

Oltre ai dati di incidenza ancor più preoccupanti sono quelli che riguardano i decessi: il tumore al colon retto si trova in seconda posizione in termini di peso percentuale sulla totalità della mortalità oncologica sia per gli uomini che per le donne (10,7% e 11,9% rispettivamente). Una così elevata mortalità è dovuta principalmente alla diffusione metastatica di tale neoplasia visto che nel 90% dei pazienti è possibile eseguire una resezione chirurgica del tumore primitivo. A dispetto dei dati poco confortanti relativi all'incidenza e alla mortalità, bisogna sottolineare che la percentuale di pazienti che sopravvivono a cinque anni dalla diagnosi registra un trend positivo e in termini di sopravvivenza l'Italia è in linea con la media europea: 49% per gli uomini e 51% per le donne. La motivazione di questo dato rassicurante è da ricercarsi negli strumenti acquisiti dalla medicina che permettono da un lato una diagnosi precoce e dall'altro maggiori possibilità di intervento terapeutico.

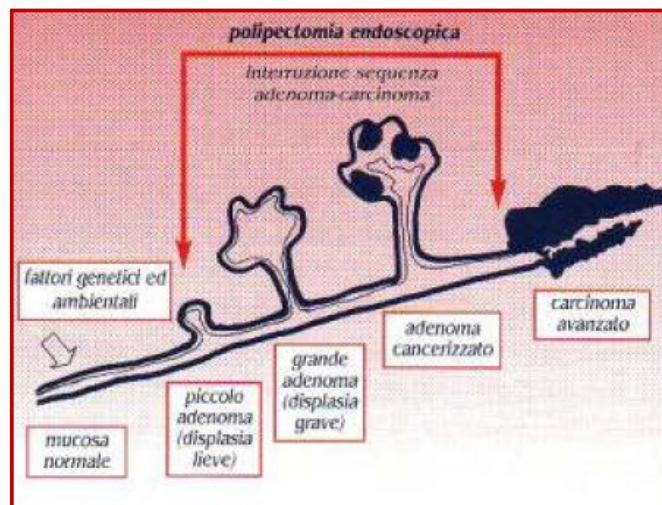
La diagnosi viene effettuata tramite colonscopia e confermata con l'esame istologico; successivamente la prima azione con intento curativo nelle neoplasie del colon retto è l'intervento chirurgico, volto a rimuovere completamente la massa tumorale, da effettuarsi entro quattro settimane dalla diagnosi. La terapia chirurgica non è tuttavia sempre possibile e il tumore viene definito avanzato quando si presenta in forma talmente estesa da non essere resecabile. Tumori avanzati, o metastatici, possono essere riscontrati alla prima diagnosi così come essere frutto di recidiva, ovvero ricomparsa della

neoplasia, a distanza di pochi anni dalla resezione, in altri siti quali fegato, polmoni, linfonodi, peritoneo. In questo caso l'unica opportunità riservata al paziente è la terapia medica, composta da chemioterapia e farmaci biologici.

### 1.3 Carcinogenesi

Nello sviluppo di tale tumore è stata ampiamente riconosciuta la validità del modello proposto da Fearon e Vogelstein basato sulla sequenza temporale "adenoma-carcinoma": una grande percentuale di carcinomi colon-rettali deriverebbe dall'evoluzione di adenomi benigni attraverso una serie di modificazioni sequenziali che precederebbero l'insorgenza della neoplasia; queste sono l'iperplasia e la displasia, da lieve a moderata displasia, la displasia grave e il carcinoma (Fearon and Vogelstein, 2004).

Visto che polipo di tipo adenomatoso, sottotipo



villosa, con dimensioni elevate e più alto grado di

Figura 3: storia naturale del cancro al colon-retto.

displasia ha una maggiore rischio di cancerizzare e che il tipo istologico più frequente è comunque l'adenocarcinoma (98% dei casi),

è necessario intensificare e generalizzare le procedure di screening in modo da individuare precocemente la presenza di polipi adenomatosi ed intervenire con la rimozione chirurgica degli stessi. Negli ultimi decenni i progressi nel campo della genetica umana e della biologia molecolare hanno aumentato le nostre conoscenze sulla biologia del cancro, migliorando la comprensione di processi cellulari che intervengono nella trasformazione dell'epitelio colon-rettale da normale a neoplastico, quali la trasformazione, la crescita e la progressione tumorale. Sulla base delle nuove acquisizioni in ambito patologico- molecolare è stato possibile ridefinire il cancro come una malattia "genomica" in quanto risultato di una serie sequenziale mutazioni che colpiscono geni coinvolti nella proliferazione e nella regolazione cellulare, conducendo ad uno stato di crescita incontrollata. Queste alterazioni genetiche che avvengono durante la formazione e lo sviluppo di un tumore rappresentano dei marcatori importanti per la diagnosi precoce del tumore stesso e lo sviluppo di terapie mirate.

La crescita cellulare è regolata da un equilibrio finemente controllato fra i geni che stimolano la crescita e quelli che la inibiscono. I primi vengono chiamati proto-oncogeni, mentre i secondi sono definiti onco-soppressori. Quando gli oncogeni sono attivati oppure gli onco-soppressori sono disattivati, le cellule possono moltiplicarsi in modo incontrollato.

I proto-oncogeni possono essere attivati o da un cambiamento della struttura del gene causato da mutazioni che colpiscono la sequenza codificante oppure dall'amplificazione del gene per duplicazione dello stesso o per mutazioni a livello promotoriale che promuovono la trascrizione. In generale, quindi, le mutazioni attivanti un proto-oncogene determinano: un aumento della quantità di proteina espressa dal gene, un'alterazione spaziale e temporale dell'espressione e un'inattivazione del dominio regolatorio del gene. Le mutazioni possono essere spontanee e quindi derivare da errori incorsi durante il processo di duplicazione del materiale genetico oppure possono venire indotte dall'esposizione del DNA ad agenti cancerogeni come per esempio radiazioni, sostanze chimiche esogene e virus.

Per quanto riguarda gli onco-soppressori il loro silenziamento può derivare o da una mutazione a livello della sequenza codificante o dei siti di splicing o più raramente da una perdita spontanea per delezione durante la divisione cellulare. La perdita di funzionalità di un onco-soppressore è tanto grave quanto l'attivazione di un oncogene e può contribuire in modo determinante alla progressione di una cellula verso la trasformazione neoplastica.

Esempi di proto-oncogeni sono i geni per i fattori di crescita e i geni codificanti le protein chinasi (proteine adattatrici, proteine GTPasi, chinasi citoplasmatiche, fattori di trascrizione e recettori con attività tirosin chinasi intrinseca).

Esempi di geni onco-soppressori sono invece i geni per gli enzimi del sistema riparatore del DNA, i geni coinvolti nell'interruzione del ciclo cellulare in caso di DNA danneggiato e i geni che regolano l'apoptosi.

### 1.3.1 K-RAS

Nei carcinomi umani l'oncogene che si rinviene più frequentemente mutato è il gene ras che appartiene tra le altre, alla famiglia di proto-oncogeni maggiormente studiate ed indagate. Fino ad oggi sono stati identificati nel genoma umano tre geni ras: N-ras, H-ras e K-ras, codificanti tutti per proteine di 21KDa coinvolte nella trasduzione del segnale e con attività di GTP-binding e GTPasica, (Bos 1989). I geni ras sono stati identificati per la prima volta da Scolnick e colleghi nel 1982 come oncogeni codificante per una proteina trasformante dei

virus del sarcoma di Harvey e Kirsten e sempre nello stesso anno Cooper, Weinberg e Aaronson individuarono la presenza di tali geni anche nel genoma umano.

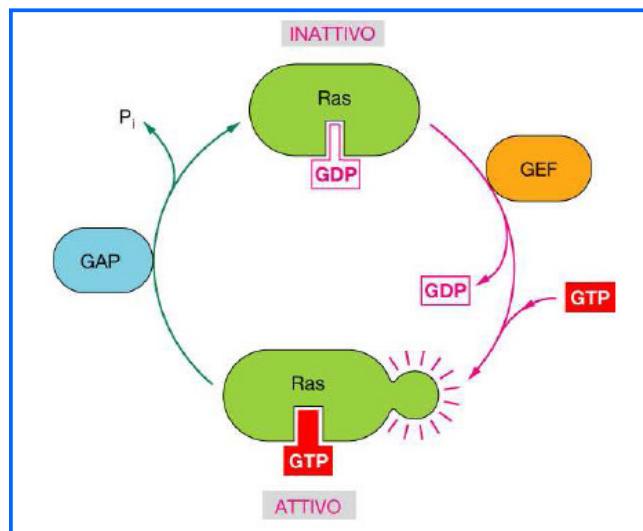


Figura 4: ciclo di regolazione dell'attività di Ras.

Le proteine ras funzionano da

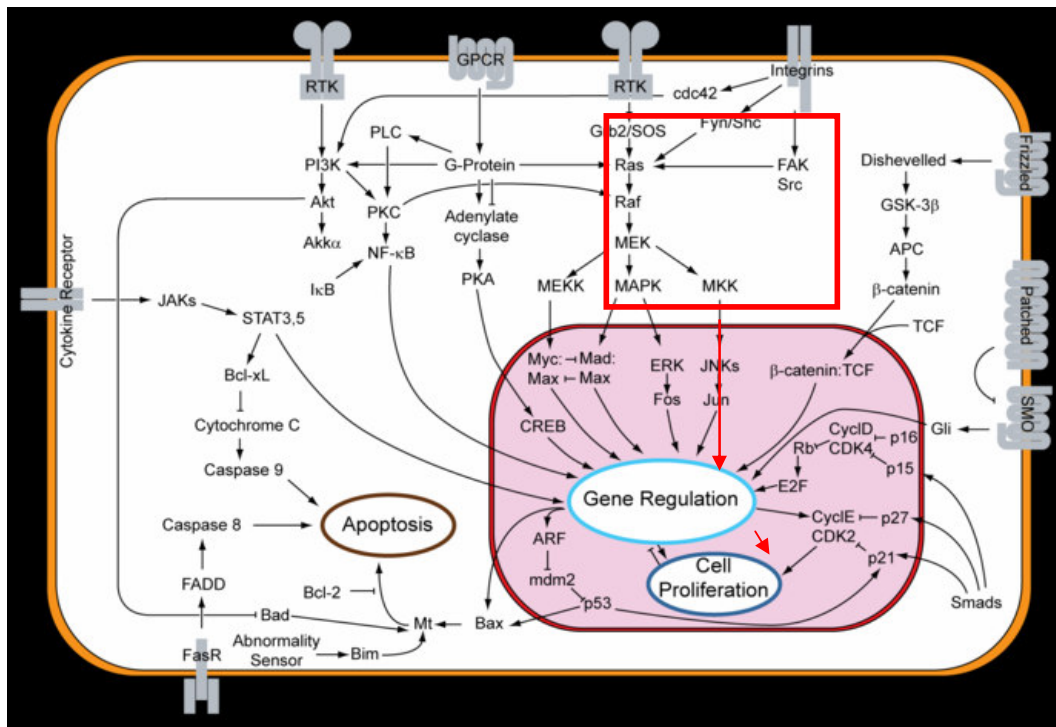
interruttori molecolari, passando da uno stato attivo, corrispondente

alla forma che lega il GTP (guanosina trifosfato), ad uno inattivo in seguito all'idrolisi del GTP a GDP (guanosina difosfato). Sia l'attività GTPasica che quella di scambio del GDP con una molecola di GTP sono regolate da proteine chiamate GEFs (Guanine Nucleotide Exchange Factors) e GAPs (GTPase activating proteins). Le prime catalizzano il rilascio del GDP, permettendo che il GTP (generalmente abbondante nel citoplasma) possa legarsi a Ras mentre le seconde incrementano la velocità della reazione di idrolisi del GTP a GDP; l'attività GTPasica intrinseca di Ras è infatti troppo lenta per garantirne un funzionamento efficace. GEFs e GAPs fungono quindi da regolatori molecolari di Ras e dall'equilibrio delle loro attività deriva anche il rapporto tra la quantità di Ras presente in forma attiva e inattiva.

Quanto più veloce è, infatti, lo scambio tra GDP e GTP, tanto minore è l'intervallo di tempo in cui Ras rimarrà inattiva; viceversa tanto più veloce è la reazione di idrolisi del GTP, tanto minore sarà l'intervallo di tempo in cui Ras si manterrà nello stato attivo.

Le proteine Ras sono coinvolte nella regolazione di numerosi processi intracellulari tra cui l'integrità del citoscheletro, la proliferazione e la differenziazione cellulare, l'adesione intercellulare, l'apoptosi e la migrazione cellulare, andando quindi ad occupare una posizione cruciale ai fini della funzionalità della cellula. Come appare evidente dalla figura sottostante, Ras è riceve segnali da moltissime proteine e a sua volta trasduce questi messaggi a valle andando ad attivare la

proteina BRAF, una chinasi della via di trasduzione del segnale delle MAP chinasi (mitogen-activated protein kinase cascade). Il target ultimo di questo pathway è rappresentato da una serie di fattori di trascrizioni (es. CREB) che una volta attivati vanno a regolare la trascrizione di geni specifici coinvolti nei processi sopra menzionati.



*Figura 5: overview dei pathways intracellulari che coinvolgono la via di trasduzione del segnale delle RAS-RAF-MAP chinasi.*

Dal momento che Ras trasduce segnali dall'ambiente extracellulare al nucleo, è chiaro che mutazioni attivanti nel gene ras o in qualsiasi altro gene codificante per proteine preposte a regolare e/o interagire con Ras, si traducono in una attivazione permanente della proteina e determinano sia una trasmissione inappropriata all'interno della

cellula dei segnali esterni sia un'attivazione della via di trasduzione delle MAP chinasi anche in assenza di segnali extracellulari. Non stupisce quindi che mutazioni nel gene ras siano state riscontrate in tumori con diverse origini, compresi: tumori al pancreas (90%), colon (50%), polmoni (30%), tiroide (50%), vescica (6%), ovaie (15%), seno, pelle, fegato, reni ed alcune leucemie (Kelloff G.J. et al., 2004). In particolar modo per quanto riguarda il cancro al colon-retto, è stato osservato che mutazioni in K-ras insorgono precocemente durante il processo di carcinogenesi e risultano nella maggior parte dei casi in un'attivazione costitutiva della proteina che guida la cellula verso una proliferazione incontrollata.

La grande maggioranza di esse cade nei codoni 12 e 13 dell'esone 2, 61 dell'esone 3 e 146 dell'esone 4 e hanno come effetto la stabilizzazione del complesso Ras-GTP (riduzione del rate di idrolisi del GTP e desensibilizzazione dall'attività di GAP). La frequenza di mutazioni a livello dei 3 codoni rispetta le seguenti percentuali: 70-75% a carico del codone 12, 20-25% a carico del codone 13 e <5% a carico del codone 61.

L'identificazione di tali mutazioni a livello di un tessuto tumorale ha grande valore terapeutico e prognostico in quanto permette di valutare la migliore strategia di intervento nei confronti del tumore e la risposta attesa del paziente alla terapia.

## **1.4 Terapia per il tumore colon-rettale metastatico**

L'approccio terapeutico nel caso di tumore avanzato può essere di due tipi, in funzione delle caratteristiche della neoplasia stessa. Se questa presenta metastasi limitate per numero, grandezza e siti coinvolti, il trattamento farmacologico può essere potenzialmente curativo, nella misura in cui ha come finalità quella di ridurre la massa tumorale e renderla resecabile. In tali pazienti la terapia, detta "conversion therapy", è solitamente più aggressiva poiché, non essendo previsto un trattamento a lungo termine bensì un successivo intervento chirurgico risolutivo, risulta tollerabile anche la maggiore tossicità che ne consegue.

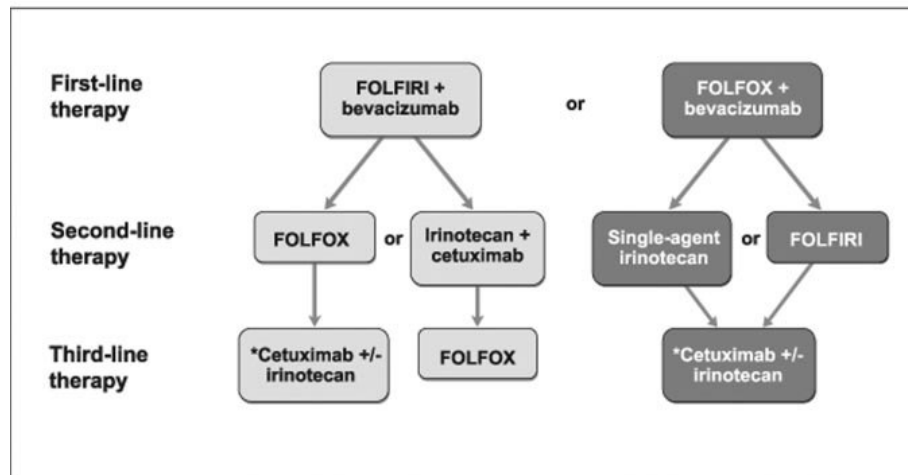
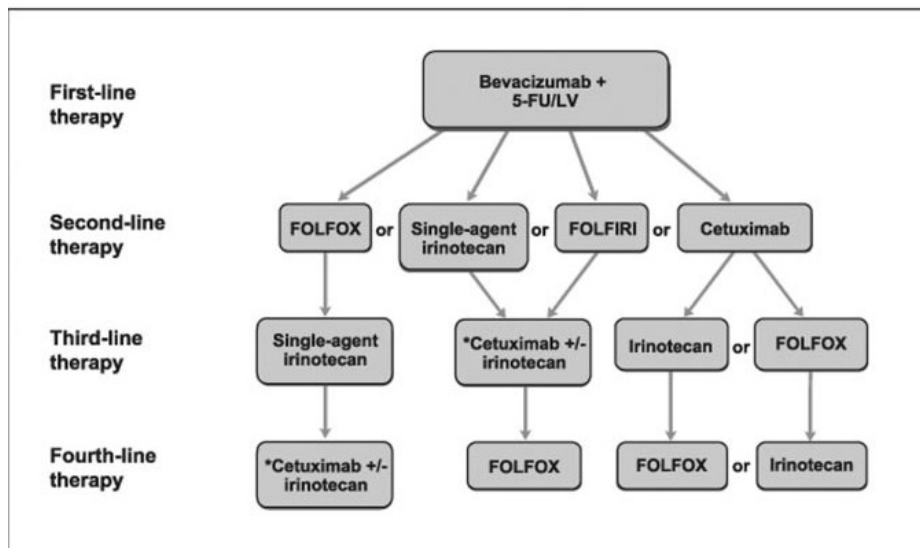
Nel caso in cui questo non sia possibile l'obiettivo della terapia è di tipo palliativo, volto cioè a prolungare la sopravvivenza garantendo al tempo stesso un'adeguata qualità di vita. In questo caso la strategia clinica richiede una più attenta valutazione degli effetti collaterali dei principi attivi somministrati per ottenere un equilibrio accettabile fra efficacia e tossicità che garantisca una buona compliance del paziente nei confronti del trattamento.

Per circa 40 anni l'unico farmaco a disposizione nel caso di cancro al colon-retto è stato il 5-fluorouracile, pirimidina modificata in grado di interferire con la sintesi del DNA e quindi con la proliferazione tumorale. Dal 1996 ad oggi si è però assistito all'approvazione di nuovi principi attivi capaci di integrare la terapia migliorandone significativamente i risultati e trasformando in taluni casi l'mCRC in

una patologia cronica, con cui è possibile convivere anche per qualche anno. Si tratta di tre farmaci citotossici irinotecano, oxaliplatino e capecitabina, rispettivamente un inibitore della topoisomerasi I, un derivato analogo del cisplatino, e un pro farmaco del 5-FU, e tre agenti biologici ovvero gli anticorpi monoclonali bevacizumab, contro VEGF, e cetuximab e panitumumab, contro EGFR. Dall'introduzione dei nuovi principi attivi ad oggi sono stati effettuati numerosi studi per determinare quale fosse la strategia terapeutica migliore. Per prima cosa è stato evidenziato come l'aggiunta di irinotecano o oxaliplatino al trattamento con solo 5-FU e leucovorina prolungasse di molto la sopravvivenza media generale (OS overall survival) e una sequenza di regimi contenenti questi tre farmaci citotossici permettesse di ottenere risultati ancor più incoraggianti. Successivamente, con l'avvento dei nuovi farmaci biotecnologici, si è cercato di stabilire in che modo questi potessero essere combinati alla chemioterapia per migliorare ulteriormente la risposta del paziente. Ad oggi l'approccio terapeutico prevede quindi l'utilizzo di tutti gli agenti attivi disponibili con il passaggio da un regime al successivo nel momento in cui si osserva progressione della malattia anche se, negli ultimi anni, la distinzione tra linee terapeutiche sembra essere sempre meno assoluta a favore del concetto di "continuum of care", ovvero una programmazione sequenziale dell'utilizzo dei farmaci a disposizione che tenga conto delle caratteristiche del paziente e degli effetti di tossicità acuta e

cumulativa che questi farmaci possono causare, soprattutto nel caso di malattie a lenta aggressività. I regimi più comunemente adottati in prima linea sono il FOLFOX, oxaliplatino con 5-fluorouracile e leucovorina infusionali, e il FOLFIRI, irinotecano con 5-fluorouracile e leucovorina infusionali, entrambi associabili all'anticorpo anti-VEGF bevacizumab; o eventualmente per una terapia meno intensiva solamente 5-fluorouracile e leucovorina con bevacizumab; successivamente vengono utilizzati anche gli altri due anticorpi monoclonali noti come Cetuximab e Panitumumab. Si tratta in realtà di semplici schemi che indicano alcune opzioni di trattamento poichè le linee guida AIOM non definiscono ancora un regime o una sequenza ottimale, che resta dunque a discrezione dell'oncologo.

Numerosi studi stanno in ogni caso dimostrando quanto i progressi acquisiti nella pratica clinica, come l'introduzione dei nuovi agenti biologici da abbinare alla chemioterapia e l'applicazione di strategie quali il cambiamento di terapia prima della progressione, la terapia di mantenimento o i periodi di interruzione, siano rilevanti nel poter dare al paziente il vantaggio di una multiterapia che risulti efficace e al tempo stesso tollerabile.

**A****Intensive therapy****B****Less intensive therapy***Figura 6A- 6B: esempi di trattamento del cancro al colon-retto metastatico.*

## **1.5 Inibitori dell'EGFR come terapia per il cancro metastatico colon rettale**

L'EGFR (epidermal growth factor receptor o HER1, o ErbB1) è una glicoproteina di membrana membro della famiglia dei recettori per i fattori di crescita (EGF), di cui fanno parte anche HER2 (ErbB2, o Neu), HER3 (ErbB3) e HER4 (ErbB4). Questi recettori, appartenenti al gruppo delle tirosin chinasi, sono fra quelli meglio caratterizzati come target nelle cellule tumorali. La loro struttura, comune a tutti e 4 i sottogruppi, è composta da un dominio extracellulare amino terminale, una regione idrofobica transmembrana, e un dominio intracellulare carbossiterminale con funzione tirosinchinasica. Quando un ligando si attacca al dominio extracellulare il recettore è indotto a formare omo o etero dimeri che portano a un cambio conformazionale e auto fosforilazione del recettore tramite la porzione tirosin chinasi. Questo meccanismo determina l'attivazione di diversi pathway di trasduzione del segnale coinvolti nella modulazione di importanti processi cellulari quali proliferazione, differenziazione, sopravvivenza e migrazione. I ligandi specifici per EGFR sono EGF e i peptidi correlati come il TGF $\alpha$  (transforming growth factor), l'anfiregulina e il fattore di crescita legante l'eparina EGF simile. La disregolazione della via del segnale dell'EGFR può avvenire in diversi modi quali iperespressione del recettore, amplificazione del gene corrispondente, mutazioni attivanti, iperespressione dei ligandi o mancanza di meccanismi

regolatori negativi. Il vantaggio per la crescita cellulare derivante da tali alterazioni è legato alla continua presenza di stimoli proliferativi e al silenziamento invece dei segnali proapoptotici. Eventi come questi promuovono dunque la trasformazione della cellula nella sua forma maligna, come è stato dimostrato prima tramite studi con virus oncogeni, poi su topi transgenici e infine mediante l'analisi di tessuti tumorali prelevati da pazienti ammalati di cancro. Un'eccessiva funzionalità di EGFR è stata riscontrata in diversi tipi di neoplasia quali il tumore al colon, testa e collo, pancreas, polmoni, mammella, rene, vescica, ovaie e cervello.

Nel caso del carcinoma metastatico al colon retto circa il 60-80% dei pazienti presenta un'espressione elevata di EGFR, a cui è solitamente legata una prognosi peggiore dovuta a minor risposta alla chemioterapia e maggiore tendenza a metastasi. Sulla base di queste informazioni risulta evidente come EGFR e la sua via del segnale possano essere un target razionale per lo sviluppo di farmaci ad azione antitumorale. Le strategie adottabili con questo intento sono svariate e comprendono l'uso di anticorpi monoclonali che legandosi al recettore ne impediscano l'attivazione da parte di ligandi endogeni, l'uso di piccole molecole capaci di inibire la funzione tirosin chinasi, l'uso di immunotossine coniugate che colpiscano in maniera specifica l'EGFR nelle cellule tumorali, l'uso di inibitori delle molecole effettrici attivate dalla cascata del segnale a valle dell'EGFR, o l'uso di oligonucleotidi antisense che riducano l'espressione di

EGFR. Per il trattamento del carcinoma colon-rettale sono ad oggi disponibili due farmaci aventi come bersaglio l'EGFR: gli anticorpi monoclonali Cetuximab e Panitumumab.

### **1.5.1 Cetuximab / Erbitux**

Cetuximab è un anticorpo monoclonale chimerico uomo-topo di tipo IgG1. Venduto con il nome commerciale di Erbitux sotto forma di soluzione per infusione, è stato sviluppato unitamente da Merck KGaA e ImClone Systems Incorporated/Bristol-Myers Squibb per il trattamento di diversi tipi di carcinoma umano che esprimano EGFR ovvero quello del colon-retto, il carcinoma a cellule squamose di testa e collo, il carcinoma nasofaringeo, pancreatico, delle ovaie e del polmone non a piccole cellule. L'indicazione terapeutica per cui ha avuto approvazione sia dall'FDA che dall'EMA prevede il suo utilizzo nel trattamento del carcinoma colon rettale e di quello a cellule squamose di testa e collo.

Cetuximab è prodotto in una linea stabile di cellule di mieloma murino (Sp2/0) tramite tecniche di DNA ricombinante. L'anticorpo chimerico è codificato dal cDNA per la regione variabile dell'anticorpo monoclonale murino M225 e dal cDNA per le regioni costanti kappa e gamma 1 umane; i cDNA sono inseriti in un vettore di espressione contenente cassette di espressione distinte per la catena leggera e per quella pesante. Legate a entrambe le catene

pesanti vi sono due porzioni di carboidrati così che il suo peso complessivo risulta essere all'incirca 152kDa.

#### **1.5.1.1 Meccanismo d'azione**

Cetuximab (indicato anche come C225-03, IMC-C225, C225, ch225) è un anticorpo altamente specifico per il recettore del il fattore di crescita epidermico. Legandosi al dominio extracellulare dell'EGFR con un'affinità circa 5-10 volte maggiore rispetto a quella dei ligandi endogeni impedisce l'attivazione del recettore da parte di questi ultimi e quindi l'attivazione dei pathway di segnale che ne derivano. Il risultato è il bloccaggio dei processi stimolanti la proliferazione cellulare essenziali nello sviluppo del fenotipo tumorale. Le principali conseguenze del legame cetuximab-EGFR sono l'inibizione della progressione del ciclo cellulare al confine fra  $G_0$  e  $G_1$ ; l'aumentata espressione di proteine regolatrici del ciclo cellulare e proteine proapoptotiche a discapito invece di quelle antiapoptotiche e l'inibizione della produzione di fattori proangiogenici quali VEGF, IL8, bFGF. Oltre a interferire nell'attivazione della cascata del segnale, induce l'internalizzazione del recettore e talvolta la down regolazione della sua stessa espressione, e sembra infine essere capace di promuovere la citotossicità cellulo mediata anticorpo dipendente (ADCC) potenziando la risposta immunitaria nei confronti delle cellule tumorali esprimenti EGFR.

Il risultato complessivo di questi eventi si manifesta con il rallentamento della proliferazione cellulare, l'induzione del processo

apoptotico, la diminuzione della formazione di nuovi vasi e la conseguente riduzione di motilità cellulare e capacità di metastasi.

#### **1.5.1.2 Trials clinici**

Cetuximab ha ricevuto nel febbraio 2004 l'approvazione dall'FDA per il suo utilizzo nel trattamento del carcinoma al colon-retto metastatico sia in combinazione con irinotecano che in monoterapia per pazienti intolleranti all'irinotecano. Nel giugno 2004 è avvenuta invece l'approvazione del farmaco da parte dell'EMEA. A conferma della sua efficacia in entrambe le modalità di utilizzo sono stati effettuati numerosi trial clinici che sono qui di seguito riportati.

#### **1.5.1.3 Cetuximab in monoterapia**

Per valutare l'attività antitumorale e la tossicità del trattamento con Cetuximab in monoterapia, Saltz e colleghi (Saltz et al., 2007) hanno realizzato uno studio clinico aperto di fase II selezionando 57 pazienti precedentemente trattati senza risultato con irinotecano e con mCRC esprimente EGFR. I risultati riferiscono una risposta parziale da parte di 5 pazienti e una minor risposta ma con stabilità della malattia da parte di 21. La sopravvivenza media è stata nel complesso di 6,4 mesi.

Uno studio più ampio è stato successivamente portato a termine da Lenz e colleghi somministrando il farmaco a 346 pazienti esprimenti EGFR e refrattari al trattamento chemioterapico con fluorpirimidine, oxaliplatino e irinotecano. La sopravvivenza libera da progressione

(PFS) è stata in media 1,4 mesi e la sopravvivenza complessiva media di 6,6 mesi, con una risposta e una sopravvivenza maggiore nei pazienti che hanno manifestato reazioni di rash cutaneo più severe.

Questi risultati già di per sé indicativi nell'evidenziare l'attività dell'anticorpo sono stati successivamente affiancati da studi di comparazione del farmaco con altre terapie.

In un trial randomizzato che ha coinvolto 572 pazienti non trattabili con oxaliplatino, irinotecano e fluoropirimidine è stata confrontata l'efficacia della somministrazione della migliore terapia di supporto aggiunta di cetuximab rispetto alla sola BSC (best supportive care). L'end point primario scelto per la valutazione è stata la sopravvivenza globale (overall survival-OS) che si è dimostrata essere significativamente più lunga nei 287 pazienti a cui era stato somministrato cetuximab con un valore medio di 6,1 mesi contro i 4,6 mesi del gruppo ricevente solo la BSC. Nonostante una maggiore incidenza di eventi avversi, e la presenza dei caratteristici rash cutanei, anche la qualità della vita è risultata meglio conservata nel gruppo trattato con l'agente biologico grazie a un minore deterioramento delle funzioni vitali e dello stato di salute complessivo.

I lavori presentati sono stati tutti attuati su mCRC esprimenti EGFR tuttavia senza dimostrare un'effettiva correlazione di questo parametro con l'efficacia della terapia. Ulteriori approfondimenti sono dunque in corso a tal proposito per verificare la possibile

validità del trattamento anche sui pazienti negativi all'esame immunohistochimico per EGFR e sembrano suggerire che la monoterapia con cetuximab presenti un profilo di attività e sicurezza che ne consenta l'utilizzo anche in questi casi.

#### **1.5.1.4 Cetuximab in combinazione con altre terapie**

Per verificare l'attività e la sicurezza di cetuximab associato al regime terapeutico FOLFIRI è stato inizialmente portato a termine uno studio multicentrico di fase I/II su 52 pazienti a cui è stato somministrato cetuximab settimanalmente e irinotecano, 5-FU e leucovorina ogni due settimane. Si è ottenuto un tasso di risposta del 48%, una PFS media di 8,6 mesi e una sopravvivenza globale media di 22,4 mesi; in 14 casi è stata inoltre possibile la resezione di metastasi non trattabili precedentemente. Visti i risultati entusiasmanti si è dunque intrapreso un trial clinico più esteso volto a esaminare l'efficacia di una combinazione di FOLFIRI e cetuximab nel trattamento in prima linea del carcinoma metastatico al colon-retto. Questo studio di fase III denominato CRYSTAL ha coinvolto 1198 pazienti con mCRC positivo all'immunohistochimica per EGFR ai quali è stata somministrato FOLFIRI da solo o in combinazione con cetuximab. Gli esiti di CRYSTAL non hanno testimoniato una differenza notevole di beneficio a favore dei pazienti trattati con cetuximab ma hanno messo in luce l'importanza di un fattore aggiuntivo per la buona riuscita della terapia: lo stato mutazionale del gene K-ras. L'analisi di questo gene, che codifica per una proteina

facente parte del pathway di segnale attivato da EGFR, si è dimostrata essenziale per la selezione dei pazienti. I successivi studi clinici che ne hanno dato riprova verranno approfonditi in seguito.

Nello studio OPUS è stato invece valutato il tasso di risposta al trattamento con FOLFOX-4 (fluoro uracile, leucovorina, oxaliplatino) abbinato a cetuximab o da solo, somministrando a due gruppi di rispettivamente 169 e 168 pazienti il cocktail farmacologico a cui erano stati assegnati fino alla progressione della terapia o allo sviluppo di tossicità inaccettabile. Anche in questo caso la terapia con cetuximab ha riscontrato un tasso di risposta globale più alto in particolar modo nei pazienti con la forma del gene K-ras wild type (OR 57% vs. 34%, PFS 8.3 vs 7.2 mesi).

Un importante studio randomizzato chiamato EPIC (Eribitux Plus Irinotecan for Metastatic Colorectal Cancer) ha verificato se l'aggiunta di cetuximab alla terapia con irinotecano potesse avere maggior successo di quella con solo irinotecano. Per questo studio multicentrico in aperto di fase III sono stati scelti 1298 pazienti in cui un precedente regime a base di fluoropirimidine e oxaliplatino avesse fallito e sono stati esaminati i valori di OS, PFS, e QOL (quality of life) con la nuova terapia somministrata. Nonostante la sopravvivenza globale fosse nei due casi comparabile, la sopravvivenza libera da progressione è stata di 1,4 mesi maggiore nel gruppo trattato con cetuximab (4 vs 2,6) e ci sono stati miglioramenti significativi anche nel tasso di risposta e nella qualità della vita.

Un successivo trial randomizzato denominato BOND ha invece comparato la terapia con irinotecano e cetuximab a quella con cetuximab in monoterapia. Nonostante fossero stati scelti pazienti con mCRC refrattario al trattamento con irinotecano, è stato il gruppo con terapia combinata a riportare una più alta PFS (4.1 vs. 1.5 mesi), OS (8.6 vs. 1.5 mesi) e tasso di risposta (22.9% vs. 10.8%), facendo ipotizzare che l'anticorpo monoclonale sia in qualche modo capace di aggirare i meccanismi di resistenza sviluppati dalla cellula contro irinotecano.

Un risultato inaspettatamente negativo è stato invece riportato dal trial COIN in cui l'aggiunta di cetuximab a un regime a base di oxaliplatino quale lo XELOX (capecitabina e oxaliplatino) non ha dato beneficio in termini di sopravvivenza globale o libera da progressione, nemmeno nei pazienti K-ras wild type. Una possibile motivazione è da ricercarsi nella tossicità causata da capecitabina e cetuximab cosomministrati, tale da ridimensionarne in maniera sostanziale l'efficacia terapeutica.

Per completare l'analisi dell'utilizzo di cetuximab con gli altri principi attivi a disposizione si è poi testata la cosomministrazione con l'anticorpo monoclonale bevacizumab. Due trial clinici in proposito hanno riferito esiti contrastanti. In BOND2 la combinazione bevacizumab più cetuximab non ha determinato un profilo di tossicità che ne compromettesse l'impiego ma anzi, in combinazione con irinotecano, ha migliorato la risposta dei pazienti naive a

bevacizumab rispetto alla sola terapia con cetuximab e irinotecano. Nello studio randomizzato CAIRO2, al contrario, l'aggiunta di cetuximab al regime con capecitabina, oxaliplatino e bevacizumab ha prodotto una significativa riduzione sia della PFS che della qualità della vita, con una maggiore incidenza di reazioni avverse alla terapia. La combinazione dei due agenti biologici richiede dunque maggiori approfondimenti per chiarire se sia effettivamente vantaggiosa.

### **1.5.2 Panitumumab / Vectibix**

Panitumumab è un anticorpo monoclonale umano del tipo IgG2, costruito usando la tecnologia XenoMouse e prodotto in una linea cellulare di mammifero (CHO) mediante tecnologia del DNA ricombinante (Kim e Grothey, 2008). La tecnologia XenoMouse prevede la creazione di topi transgenici che esprimono le catene leggere e pesanti delle immunoglobuline umane e in cui i loci codificanti per gli anticorpi murini endogeni sono stati inattivati per delezione. Sfruttando la tecnologia dell'ibridoma, i topi ricombinanti sono stati poi immunizzati con cellule della linea A431, derivanti da carcinoma epidermoide cervicale, che esprimono elevati livelli (>1 milione di copie) di EGFR sulla loro superficie e il clone di cellule B di interesse (clone E7.6.3. anche noto come ABX-EGF o panitumumab), è stato immortalizzato in cellule CHO (Chinese hamster ovary cells)(Carteni et al., 2007).

A livello commerciale Panitumumab viene venduto dalla Amgen Europe B.V. con il nome di Vectibix sotto forma di soluzione per infusione. Il farmaco è indicato come monoterapia per il trattamento di pazienti con carcinoma coloretale metastatico, esprime il recettore per il fattore di crescita epidermico (EGFR) e in cui il gene KRAS non sia mutato (wild type), dopo fallimenti di regimi chemioterapici contenenti fluoropirimidine, oxaliplatino e irinotecan. Tale indicazione terapeutica trova riscontro nei documenti di approvazione del farmaco, emessi nel 2006 dalla FDA (Food and Drug Administration), nel 2007 dall' EMEA (European Medicines Agency) e, a distanza di un anno, dall'Health Canada.

#### **1.5.2.1 Meccanismo d'azione**

Panitumumab è un anticorpo monoclonale umano caratterizzato da elevata affinità e potenza per il recettore EGFR quindi in grado di legarsi al suo substrato in modo specifico e con una forza di legame maggiore ( $K_d = 5 \times 10^{-11}$ ) a quella dei ligandi endogeni. A livello molecolare si comporta da antagonista recettoriale, impedendo quindi il legame al recettore dell'EGF, del TGF- $\alpha$  e inibendo così la via di trasduzione del segnale che dall'EGFR porta all'attivazione di geni responsabili della proliferazione e della crescita cellulare e bloccando la stimolazione di crescita autocrina. In tal senso, quindi, questo anticorpo esercita un'azione antitumorale che si è dimostrata dipendere da differenti meccanismi molecolari in parte simili a quelli menzionati per il Cetuximab. Oltre all'inibizione degli EGFR

signaling pathways, infatti, determina sia una down regolazione dell'espressione del recettore EGFR che un' internalizzazione del recettore stesso causando una diminuzione del numero di molecole presenti in superficie e disponibili al legame con i loro substrati endogeni. È, inoltre, in grado di promuovere la ADCC e la citotossicità complemento dipendente, potenziando così il ruolo del sistema immunitario nell'arresto della crescita tumorale. È stato poi osservato che in vitro Panitumumab inibisce la produzione di VEGF e IL-8, ostacolando indirettamente l'angiogenesi tumorale. In ultima istanza il farmaco si è dimostrato particolarmente attivo contro tumori solidi umani di diversa natura come il cancro alla mammella, al pancreas, al rene e all'ovaio risultando così efficace anche per quei tumori che non esprimono livelli così elevati di EGFR (Snyder et al, 2005). La capacità del farmaco di eradicare completamente tumori preesistenti deriva probabilmente dalla sua abilità di penetrare all'interno della massa tumorale e di saturare i recettori EGFR in un modo che è tempo e dose dipendente. Sebbene l'effetto finale del Panitumumab e del Cetuxumab sia lo stesso e cioè l'arresto del ciclo cellulare in G0/G1, l'uso del primo è preferibile in quanto essendo un anticorpo interamente umano è pressoché esente dal causare reazioni di ipersensibilità nell'ospite trattato; al contrario, il trattamento di tumori con gli anticorpi chimerici (Cetuximab) o umanizzati (Bevacizumab), espone a un rischio non trascurabile di reazioni allergiche in quanto questi farmaci contengono una percentuale

relativamente elevata (rispettivamente dal 5% al 30%) di sequenza eterologa murina. Un aspetto ancora più rimarchevole è il fatto che il Panitumab, se usato in ionoterapia, è in grado di eradicare il tumore e la concomitante somministrazione di agenti chemioterapici non fa altro che aumentare l'attività del farmaco attraverso meccanismi additivi; per quanto concerne il Cetuximab invece, l'anticorpo murino esercita solo un limitato effetto su masse tumorali preesistenti e la sua azione si esplica appieno solo quando utilizzato in associazione alla chemioterapia o eventualmente alla radioterapia. Questa evidenza potrebbe forse derivare dal fatto che Panitumumab possiede un'affinità 8 volte maggiore del Cetuximab verso l'EGFR e quindi l'affetto del primo è molto più marcato e incisivo.

#### **1.5.2.2 Trials clinici**

Dal 1997 ad oggi si sono succeduti numerosi studi tesi a indagare l'efficacia del Panitumumab da solo e in associazione con gli agenti chemioterapici, finora utilizzati in prima linea per la cura del cancro colon-rettale metastatico.

I primi esperimenti sono stati condotti in modelli murini dopo trapianto xenografo di tumori solidi di varia natura ed hanno portato a validare il Panitumumab come un efficace agente antineoplastico in grado di prevenire la crescita tumorale e di eradicare la massa tumorale (Yang et al., 2001).

In uno studio di fase I, volto a valutare la risposta di diversi tumori (colon-retto, polmone, prostata, rene, pancreas, esofago) a differenti

dosi di Panitumumab, è emerso che il farmaco è particolarmente attivo nei confronti del cancro metastatico coloretale e risulta generalmente ben tollerato alle dosi di somministrazione (0.01-5.0 mg/kg/7giorni, 6.0 mg/kg/14giorni, 9.0 mg/kg/21giorni).

Alla luce dei risultati incoraggianti, è stato condotto uno studio di fase II utilizzando Panitumumab in monoterapia su 148 pazienti con mCRC, precedentemente trattati e refrattari alla chemioterapia (Marshall et al., 2005). In termini di risposta al trattamento gli esiti sono stati simili a quanto osservato per il Cetuximab in monoterapia: 15 pazienti, infatti, hanno risposto in modo parziale al trattamento mentre in 54 la malattia è rimasta stabile. Migliori invece gli outcomes della sopravvivenza globale media (OS) che è stata di 9,4 mesi e della sopravvivenza libera da progressione (PFS) che è stata di 2,5 mesi. Il farmaco si è dimostrato ancora una volta sicuro tenendo conto della bassa incidenza di effetti collaterali di grado elevato (3/4), pari al 14% e soprattutto del tipo di eventi avversi, nella maggior parte dei casi conseguenti a una tossicità cutanea (rash cutanei, prurito, nausea, vomito e diarrea).

La conferma delle osservazioni iniziali sul beneficio clinico, legato all'utilizzo del Vectibix, nel trattamento del cancro del colon-retto metastatico (mCRC) si ebbe con uno studio di fase III (Van Cutsem et al., 2007), randomizzato e controllato, condotto su 463 pazienti affetti mCRC che hanno presentato una progressione della malattia durante o dopo una precedente chemioterapia. L'obiettivo era quello di

valutare l'efficacia del farmaco, in monoterapia, sul tumore metastatico al colon-retto positivo all'EGFR in pazienti in cui i regimi terapeutici a base di oxaliplatino e erano falliti. I dati ottenuti hanno chiaramente comprovato la superiorità del Panitumumab rispetto alla BSC dato che la percentuale di progressione della malattia o di morte nei pazienti che hanno ricevuto Vectibix alla dose di 6mg/kg è stata ridotta del 40% rispetto ai pazienti che hanno ricevuto la sola BSC, mentre per quanto riguarda la sopravvivenza libera da progressione le percentuali sono state del 45,5% per Vectibix e BSC e del 24,6% per BSC da sola.

Il passo successivo fu quello di approfondire gli effetti del Vectibix quando combinato con la chemioterapia convenzionale. A tal fine è stato progettato un trial clinico di fase II testando i regimi terapeutici Panitumumab e IFL (irinotecan 125 mg/m<sup>2</sup>, leucovorin 20 mg/m<sup>2</sup> e bolus 5-FU 500 mg/m<sup>2</sup>) e Panitumumab più FOLFIRI (irinotecan 180 mg/m<sup>2</sup>, leucovorin 400 mg/m<sup>2</sup>, bolus 5-FU 400 mg/m<sup>2</sup> e 2.400-3000 mg/m<sup>2</sup> per infusione) in pazienti con mCRC, EGFR positivo, non precedentemente trattati. In entrambi i casi si è ottenuto un tasso di risposta maggiore al 40% e una PFS rispettivamente di 5,6 e 10,9 mesi. L'associazione con il FOLFIRI si è rivelata ancor più vantaggiosa in relazione alla minore incidenza di diarrea (25% vs 58%) e di effetti avversi gravi quali eventi trombo embolici, embolia polmonare e ipomagnesemia.

Gli esiti promettenti degli studi condotti hanno portato ad esplorare la possibilità di incorporare il Vectibix all'interno dei regimi di trattamento di prima scelta e ciò ha trovato attuazione nello studio PACCE in cui è stata valutata la risposta al trattamento con bevacizumab e oxaliplatino o irinotecan, da soli (regime A) o con Panitumumab (regime B), in 812 pazienti con cancro colon-rettale metastatico. In tal caso l'associazione dei chemioterapici con il Panitumumab non si è rivelata efficace a causa di una riduzione, statisticamente significativa, della PFS e dell'OS. Anche il profilo di sicurezza del regime B non è risultato soddisfacente; il 19% dei pazienti dovette lasciare lo studio e interrompere il trattamento a causa di seri eventi avversi, il 35% dei pazienti morì, mentre in una percentuale di casi superiore rispetto ai casi documentati in precedenza si osservarono, accanto alla nota tossicità cutanea, diarrea, deidratazione, squilibri osmotici e infezioni. Complessivamente quindi il trattamento con panitumumab in associazione con chemioterapia e bevacizumab è poco tollerato e associato a un rapporto rischio-beneficio sfavorevole.

Sulla base dei dati raccolti non si è riusciti a definire con precisione il ruolo del Panitumumab nel trattamento del cancro al colon-retto. Ulteriori trials devono essere messi a punto per determinare la sicurezza del Vectibix in associazione con la chemioterapia standard e la configurazione terapeutica (se in prima o seconda linea di trattamento).

### 1.5.3 Markers predittivi

L'identificazione di determinanti genetici di resistenza primaria alle terapie rivolte contro l'EGFR nei carcinomi del colon-retto è fondamentale per almeno due ragioni. La prima è l'identificazione prospettica dei pazienti che potrebbero effettivamente beneficiare dei due MoAb (Monoclonal Antibodies) e di quelli quindi che non dovrebbero essere trattati né con il Cetuximab né con il Panitumumab; la seconda è che la comprensione delle basi molecolari della resistenza ai trattamenti con MoAb rivolti contro l'EGFR potrebbe consentire il disegno razionale di strategie terapeutiche alternative. Grazie a numerose analisi retrospettive è stato possibile individuare almeno due marcatori predittivi di efficacia di terapia; uno riguarda l'espressione di EGFR che deve essere presente in una percentuale di cellule tumorali analizzate superiore all'1%, mentre l'altro è la presenza del gene KRAS nella forma wild-type (non mutata). Tanto più elevata è l'espressione di EGFR tanto maggiore è anche l'efficacia dei farmaci e l'entità degli effetti collaterali; in relazione al gene kras si è visto invece le mutazioni del gene annullano l'efficacia terapeutica dei farmaci pertanto si rende inutile la loro somministrazione a quei pazienti con varianti alleliche di KRAS diverse dal wild type. La presenza di mutazioni di KRAS spiega, comunque, solamente il 30-40% circa dei casi di mancata risposta (Di Fiore et al., 2007). Per approfondire meglio la questione Di Nicolantonio e colleghi (Di Nicolantonio et al., 2010) hanno

analizzato retrospettivamente la risposta al trattamento con cetuximab o panitumumab di 113 soggetti affetti da mCRC. La risposta clinica è stata valutata ogni 6-8 settimane mediante indagini radiologiche (tomografia computerizzata o risonanza magnetica) adottando per la valutazione i Response Evaluation Criteria in Solid Tumors e classificando la risposta tumorale come risposta parziale (PR, partial response), stabilità di malattia (SD, stable disease) e PD (progressive disease). I soggetti SD o con PD sono stati definiti come “non responders”. Essendo noto che le mutazioni di KRAS e BRAF nel CRC sono mutualmente esclusive (Frattini et al., 2004), è stata verificata sperimentalmente tale relazione ed è stata anche studiata la risposta alla terapia nei pazienti con BRAF mutato. A tal proposito è stato interessante notare come nessuno dei 22 pazienti con KRAS wild-type, andato incontro a PR, presentasse mutazioni di BRAF, mentre 11 pazienti dei soggetti non responders fossero portatori della mutazione BRAFV600E. Valutando la PFS o l’OS di pazienti portatori di BRAF mutato è stato possibile, inoltre, correlare la presenza della mutazione BRAFV600E con una prognosi peggiore legata all’inefficacia della terapia basata sugli MoAb. Infatti, studi condotti su cellule HT-29 e COLO-25, due linee cellulari derivate da neoplasie del colon-retto in cui era stata precedentemente identificata la mutazione, hanno messo in luce che la mutazione rende le cellule meno sensibili, se non refrattarie, al trattamento con cetuximab e panitumumab. Risulta quindi utile combinare l’analisi mutazionale di

KRAS e BRAF per selezionare prospetticamente i soggetti affetti da mCRC eleggibili per il trattamento con MoAB rivolti contro l'EGFR (Loupakis et al., 2009).

## 1.6 Farmacogenetica

La possibilità di predire la risposta farmacologica di un paziente sulla base del corredo genetico dell'individuo stesso è il concetto base della farmacogenetica, nota comunemente anche con il termine di medicina personalizzata. Per farmacogenetica (abbreviazione PGt) si intende, infatti, lo studio delle variazioni nelle caratteristiche del DNA in relazione alla risposta ai farmaci (dal documento "*Note for guidance on definitions for genomics, pharmacogenetics, genomic data and sample coding categories*"). Lo sviluppo di questa branca della farmacologia generale è derivato innanzitutto dalla notevole quantità di informazioni riguardanti il genoma umano divenute accessibili all'intera comunità scientifica al completamento del Progetto Genoma Umano. Grazie agli sviluppi in campo bioinformatico, è stato poi possibile organizzare, elaborare e catalogare l'immensa quantità di dati derivanti dal sequenziamento del genoma umano in database e in tools bioinformatici di facile utilizzo, cosa che ha contribuito a rendere queste informazioni molto più fruibili. In ultima istanza ciò che ha reso veramente possibile l'affermarsi della medicina personalizzata è stato lo sviluppo di nuove tecniche diagnostiche, altamente sensibili, specifiche e poco costose, in grado di analizzare

in tempi brevi milioni di polimorfismi (STRs, *short tandem repeats*; SNPs, *single nucleotide polymorphism*; CNV, *copy number variations*) collegati alla suscettibilità ad una certa malattia (ad esempio alzheimer o schizofrenia) piuttosto che al profilo individuale di risposta ad un farmaco (geni coinvolti nell'assorbimento, nel metabolismo e nell'escrezione di una sostanza) (Recchia e Pirazzoli, 2008). L'FDA (*Food and Drug Administration*) ha redatto e aggiorna trimestralmente un elenco dei "valid genomic biomarkers in the context of approved drug label" cioè dei biomarcatori genomici ritenuti validi ai fini delle informazioni per l'uso dei farmaci. I biomarcatori genomici vengono classificati, in relazione all'utilizzo clinico dei relativi test, in tre livelli: test obbligatorio, test raccomandato e test solo informativo. Attualmente l'elenco è costituito da 27 biomarcatori, di cui 4 sono test obbligatori per la somministrazione del farmaco, 9 sono raccomandati e 14 sono solo informativi. Tra i test genetici obbligatori vi è per esempio quello che valuta l'espressione dell'EGFR in riferimento alla somministrazione del farmaco Cetuximab. In Europa il primo test farmacogenetico ufficialmente riconosciuto valido ai fini delle informazioni per l'uso di un farmaco è lo screening per l'allele HLA-B\*5701 per il farmaco Abacavir nel trattamento dell'infezione da HIV.

La portata del cambiamento che la farmacogenetica può indurre nella terapia è davvero ampia dato che per nessun farmaco può essere esclusa a priori l'influenza, più o meno marcata, di fattori genetici

sulla sua efficacia e sulla sicurezza individuale. Questo è valido soprattutto per quei farmaci con una banda terapeutica ristretta (Antitumorali) o per i quali la posologia varia moltissimo da paziente a paziente (Warfarin); in tal caso, infatti, diventa di fondamentale importanza poter disporre di un test genetico che a priori possa predire la risposta al farmaco e che quindi permetta di individuare la dose efficace e non tossica per ogni individuo. Il razionale dell'introduzione dei test genetici nella pratica clinica è che da un lato si somministra al paziente la terapia più efficace evitando quindi sia lo spreco di tempo collegato alla scelta di regimi terapeutici inadatti, sia ricadute psicologiche negative sul paziente stesso dovute all'inappropriatezza della terapia prescritta; dall'altro lato è possibile valutare a priori il rischio di eventi avversi e quindi di evitare di somministrare farmaci o dosi troppo elevate di farmaci che potrebbero danneggiare il paziente. Non bisogna dimenticare, infatti, che ogni anno negli USA si verificano più di 2 milioni di casi di reazioni avverse al farmaco e che negli Stati Uniti ed in Europa la quarta causa di morte è rappresentata proprio dalle reazioni avverse ai farmaci. Esse costituiscono un problema clinico ma anche economico rilevante, esasperato dal fatto che i farmaci sviluppati fino ad oggi non tengono conto delle singole individualità dei soggetti bensì della popolazione media, per cui funzionano per la stragrande maggioranza della popolazione ma risultano inefficaci se non tossici per una buona fetta della stessa. Tale riflessione ha portato le case

farmaceutiche a cambiare l'iter di sviluppo dei farmaci, introducendo come parte integrante di questo processo gli studi di farmacogenetica i quali possono generare informazioni cruciali per la comprensione del profilo di efficacia e tollerabilità del farmaco e per supportare le decisioni da prendere sullo sviluppo del farmaco stesso.

Di pari passo con la conoscenza di nuovi biomarcatori si è sviluppato un numero sempre maggiore di kit diagnostici in grado di analizzare tali markers tanto che la terapia personalizzata si sta affermando rapidamente. A confermarlo è anche una crescita esponenziale degli esami farmacogenetici richiesti dalle ULSS come quelli a supporto del trattamento del tumore al seno e al colon retto; da quando la European Medicines Agency (EMA) ha autorizzato l'utilizzo dei farmaci inibitori di EGFR (panitumumab e cetuximab) per i pazienti con CRC negativi per la presenza di mutazioni in K-RAS (Doc. EMA: Erbitux, Vectibix), il numero dei malati sottoposti al test per la ricerca delle mutazioni del gene K-RAS (che predice la resistenza alla terapia anti-EGFR) è balzato dal 2,5% nel 2008 al 42% all'inizio del 2009 (fonte: *American Society of Clinical Oncology - Asco*).

Alla luce di quanto riportato emerge che sicuramente la farmacogenetica ha consentito la trasformazione della medicina tradizionale in medicina molecolare, cambiamento di certo legato anche al progresso delle tecniche e tecnologie di analisi e degli strumenti diagnostici (Lee et al., 2010).

### **1.6.1 Sviluppi della farmacogenetica**

Per poter essere usato in clinica, un test farmacogenetico deve possedere determinate caratteristiche. In primo luogo è necessario individuare un'associazione tra un genotipo e la risposta a un certo farmaco nella popolazione generale o in una sottopopolazione; deve essere comprovata la validità analitica e clinica del test, quindi il metodo di determinazione del genotipo deve possedere sufficiente sensibilità, specificità e valore predittivo; infine, ci devono essere evidenze scientifiche riguardo all'utilità clinica del test, cioè la sua applicazione in ambito clinico deve consentire di migliorare la risposta alla terapia e la compliance del paziente e quindi il rapporto rischio/beneficio legato alla somministrazione del farmaco.

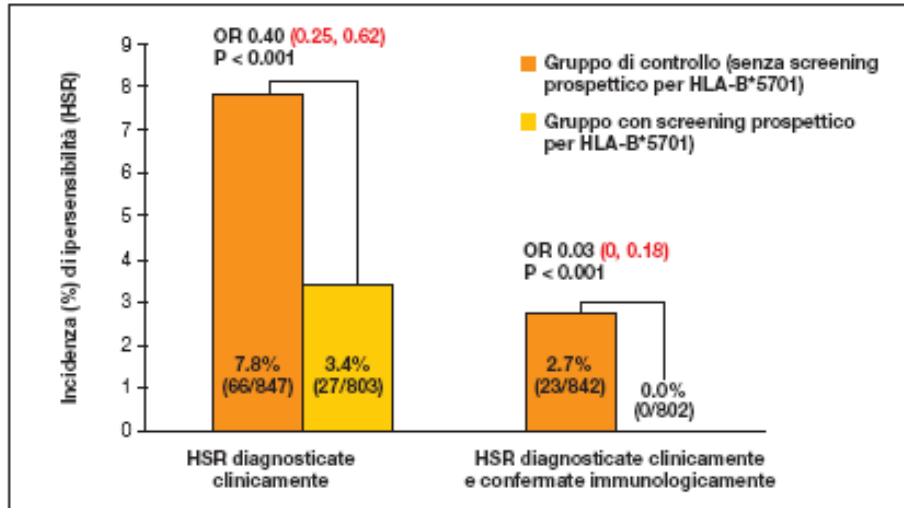
Trai test farmacogenetici, per i quali vi sono evidenze scientifiche rilevanti sul vantaggio derivante dall'applicazione della farmacogenetica, troviamo: a) la ricerca dell'allele HLA-B\*5701 in pazienti HIV+; b) la ricerca delle mutazioni nel gene della vitamina K epossido reduttasi (VKOR) e dei polimorfismi dell'enzima 2C9 del citocromo P450, implicati nella variabilità dell'effetto dose/risposta dei derivati della cumarina (Warfarin); c) la tipizzazione delle varianti del gene tiopurina S-metiltransferasi (TPMT), per la predizione del rischio di mielosoppressione grave in pazienti trattati con i farmaci tiopurinici; d) l'identificazione delle varianti alleliche \*2 e 3\* del gene CYP2C19 coinvolte nel metabolismo di numerosi farmaci; e) la ricerca delle varianti alleliche \*3, \*4, \*5 e \*6 del gene

CYP2D6 responsabili del fenotipo “*Poor Metabolizer*” (PM) del Tamoxifene, farmaco utilizzato per il trattamento del cancro al seno nelle donne in menopausa.

#### **1.6.1.1 Abacavir e Allele HLA-B\*5701**

Abacavir è un farmaco antivirale per il trattamento dell’infezione da HIV, che agisce inattivando la retrotrascrittasi del virus. Gruppi di ricercatori diversi (Marshall, Martin et al.,) hanno verificato l’esistenza di una associazione tra una reazione di ipersensibilità (HRS) e la presenza dell’allele HLA-B\*5701, tanto che sulla base dei medesimi studi si è sviluppato un test predittivo del rischio di ipersensibilità ad Abacavir. L’intensa attività scientifica che ha caratterizzato lo sviluppo del test, ha intrapreso la via di un’ampia applicazione in ambito clinico grazie allo studio PREDICT-1, uno studio prospettico, randomizzato, in doppio cieco che ha coinvolto 1956 pazienti reclutati da 314 centri in Europa e Australia. I risultati dello studio hanno dimostrato che lo screening HLA-B\*5701 annulla le reazioni di ipersensibilità diagnosticate clinicamente e confermate con patch test e riduce a meno del 50% le reazioni di ipersensibilità diagnosticate con solo criterio clinico (Mallal S. et al., 2002). Sulla base di molte evidenze scientifiche, l’EMEA ha emesso un’opinion, recepita poi anche dall’AIFA e dall’RCP del prodotto, secondo cui il test dell’ HLA-B\*5701 deve essere eseguito prima di iniziare il trattamento con Abacavir, in modo da escludere dal trattamento con

il farmaco i pazienti portatori della variante allelica, a meno che nessuna altra opzione terapeutica sia disponibile.



*Figura 7: efficacia nello screening per l'HLA-B\*57:01 nel ridurre l'incidenza della reazione di ipersensibilità ad Abacavir. Risultati dello studio PREDICT-1 (tra parentesi viene riportato il numero delle HSR(reazioni avverse) osservate sul totale dei pazienti in quel braccio di trattamento), (Pirazzoli A., Recchia G., 2008).*

### 1.6.1.2 Warfarin e polimorfismi dei geni VKOR e CYP2C9

Il Warfarin è un farmaco anticoagulante che trova ampia applicazione nella prevenzione primaria e secondaria del tromboembolismo venoso ed arterioso. La ristretta finestra terapeutica, l'ampia variabilità del rapporto dose/risposta e le numerose interazioni farmacologiche ed alimentari, rendono tuttavia necessario affiancare alla somministrazione del farmaco un costante

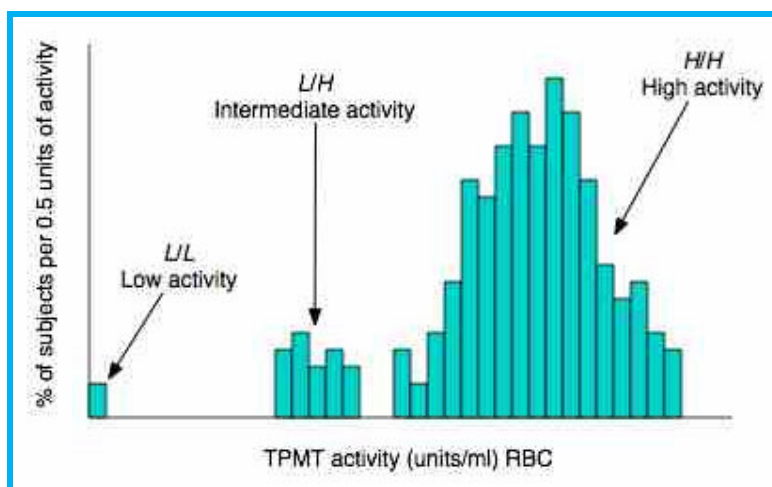
follow-up clinico in modo da ottimizzare il dosaggio e ridurre al minimo i rischi connessi all'utilizzo del Warfarin, come emorragie ed eventi trombotici (Kamali and Wynne, 2010). Oramai è noto che alla base della variabilità inter-individuale nella risposta al farmaco vi sono fattori fisiologici come l'età, il sesso, lo stile di vita e le funzioni epatiche e renali e fattori ereditari tra cui i polimorfismi dei geni CYP2C9 (che catabolizza l'enantiomero S del farmaco) e VKORC1 (*Vitamin K Epoxide Reductase*, enzima bersaglio del farmaco, che attiva fattori della coagulazione). Gli studi condotti a riguardo hanno messo in evidenza che gli alleli CYP2C9\*2 e \*3 codificano per isoforme meno attive dal punto di vista metabolico, tanto che gli individui portatori avrebbero un rischio relativo maggiore di emorragie di 2,26 e necessiterebbero di una dose minore di Warfarin di circa 1mg. Modificazioni del dosaggio andrebbero condotte anche per quei soggetti portatori di polimorfismi nel gene VKORC1, che nella maggior parte dei casi determinano una riduzione dell'attività enzimatica e quindi si associano a un maggior rischio di emorragia (Seip et al., 2010). L'enzima VKORC1, infatti, ricicla la vitamina K che, nella sua forma ridotta, rappresenta un cofattore essenziale per la gamma-carbossilazione dei fattori attivi II, VII, IX e X della coagulazione. Attualmente, in Italia e in Europa, le importanti informazioni ed indicazioni prodotte finora dalla comunità scientifica, non sono state ancora recepite a livello di pratica clinica, sebbene la FDA abbia già raccomandato l'utilizzo di test

farmacogenetici in grado di predire la risposta individuale al farmaco ([http://www.fda.gov/cder/genomics/genomic\\_biomarkers.htm](http://www.fda.gov/cder/genomics/genomic_biomarkers.htm)).

### **1.6.1.3 Farmaci tiopurinici e TPMT (Tiopurina S-metiltransferasi)**

La Tiopurina S-MetilTransferasi (TPMT) è un enzima del pathway metabolico della sintesi delle purine, che catalizza la S-metilazione di farmaci tiopurinici immunosoppressori e citotossici come la 6-mercaptopurina (6-MP), la 6-tioguanina e l'azatioprina (Imurek). Quest'ultimo farmaco è un potente immunosoppressore utilizzato nel trattamento dei disturbi mieloproliferativi quali la leucemia non-linfocitaria acuta e la leucemia linfoblastica acuta (ALL); data la sua tossicità, le vie metaboliche coinvolte nella sua detossificazione e gli enzimi interessati sono ben conosciuti. È, infatti, noto che l'azatioprina viene convertito in 6-MP che in parte è metabolizzata in 6-tioguanina (principio attivo) dall'enzima HPRT (*Hypoxanthine-guanine-phosphoribosyl transferase*) e in parte è detossificata dalla TPMT. Ne deriva che individui con attività della TPMT bassa (*low metabolizers*) presentano quantità circolanti del principio attivo maggiori, quindi richiedono generalmente dosi inferiori di farmaco per ottenere l'effetto terapeutico e manifestano con più frequenza effetti secondari dovuti a un sovra-dosaggio, tra cui aplasia midollare che a volte può essere mortale; al contrario, soggetti con attività elevata di TPMT richiedono dosi maggiori del farmaco per beneficiare

degli effetti terapeutici e non andare incontro a recidiva dopo il termine del trattamento chemioterapico. Sulla base di studi farmacogenetici, è stato possibile suddividere la popolazione in tre gruppi, rispetto al livello della TPMT negli eritrociti (*low, intermediate e high activity*). Tale variabilità nell'attività enzimatica correla perfettamente con la presenza di determinate varianti alleliche, nel complesso 28, dovute nella maggior parte dei casi a SNPs non sinonimi.



**Figura 8:** attività dell'enzima TPMT in relazione al genotipo. Analisi condotta in 298 soggetti. L'88% della popolazione è caratterizzata da livelli elevati di attività enzimatica; l'11% della popolazione mostra l'attività intermedia; mentre lo 0,3% non ha alcuna attività enzimatica rilevabile.

Le varianti alleliche più studiate e con maggior impatto clinico sono la \*2, la \*3A, la \*3B e la \*3C e di queste, i polimorfismi TPMT\*3A e TPMT\*3C (metabolizzatori lenti) sono i più diffusi e raggruppano circa il 90% degli alleli difettosi in Europa (Salavaggione et al., 2005).

Attualmente non sono presenti sul mercato dei test molecolari per l'identificazione degli SNPs del gene TPMT, sebbene la sua genotipizzazione risulterebbe di grande aiuto per predire il rischio di mielosoppressione grave in pazienti trattati con farmaci tiopurinici e per ottimizzare la dose di tali farmaci prima dell'inizio del trattamento.

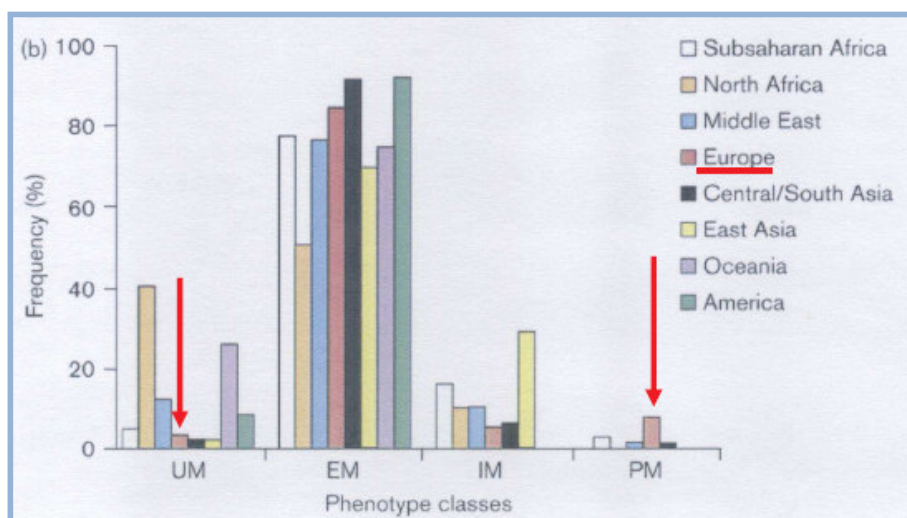
#### **1.6.1.4 Tamoxifene e Varianti Alleliche del gene CYP2D6**

Il Tamoxifen è un modulatore selettivo dei recettori per gli estrogeni (ER), ampiamente utilizzato negli ultimi 25 anni sia nella terapia adiuvante delle forme di cancro alla mammella ER-positivi, che costituiscono il 70-80% di tutte le forme di carcinomi mammari, sia nella prevenzione primaria in donne ad alto rischio.

Il farmaco si comporta, infatti, da antagonista del recettore degli estrogeni pertanto la sua azione si esplica competendo con gli estrogeni per il legame al sito di binding del recettore presente nel tessuto tumorale; senza un continuo rifornimento di estrogeni, le cellule tumorali non si sviluppano e la capacità del tumore di estendersi viene ridotta (Orlando et al., 2010). In realtà il vero principio attivo non è tanto il Tamoxifen quanto i suoi metaboliti Endoxifene e 4-Idrossi-Tamoxifen, i quali presentano un'attività antiproliferativa molto più elevata, legata ad una molto maggiore capacità di binding. Un ruolo chiave nel metabolismo del Tamoxifen è svolto dagli enzimi CYP2D6 e CYP3A4, per i quali nella

popolazione esistono centinaia di varianti alleliche responsabili di variazioni anche significative dell'attività enzimatica. In particolare si è visto che certi polimorfismi del gene CYP2D6, si associano ad un outcome clinico sfavorevole nei pazienti affetti da cancro al seno e trattati con il Tamoxifen. A tal proposito, per quanto riguarda la popolazione caucasica, le varianti alleliche di maggiore interesse sono la \*3, la \*4, la \*5 e la \*6, che costituiscono oltre il 90% di tutte le varianti finora descritte all'interno di questa popolazione e sono associate alla produzione di una proteina completamente inattiva e/o con attività enzimatica minore.

A seconda siano presenti in etero o in omozigosi, tali polimorfismi determineranno rispettivamente una maggiore o una minore capacità di metabolizzare il Tamoxifen e quindi una diversa efficacia del farmaco.



**Figura 9:** rappresentazione grafica della distribuzione per frequenza delle quattro classi fenotipiche dell'attività dell'enzima CYP2D6, suddivise per popolazione.

L'importanza di tale evidenza è stata riconosciuta anche dall'FDA Advisory Panel che nell'ottobre del 2006 ha richiesto la modifica del foglietto illustrativo di specialità medicinali a base di Tamoxifen.

#### **1.6.1.5 Farmaci e Varianti alleliche del gene CYP2C19**

I citocromi P450 sono i principali responsabili delle reazioni di fase I (ossidazioni) di un'ampia varietà di composti sia endogeni che esogeni, chimicamente e biologicamente non correlati. Nell'uomo sono state identificati finora più di 63 geni, di cui 57 geni completi e 5 pseudogeni, codificanti per differenti isoforme e divisi in 18 famiglie e 43 sottofamiglie.

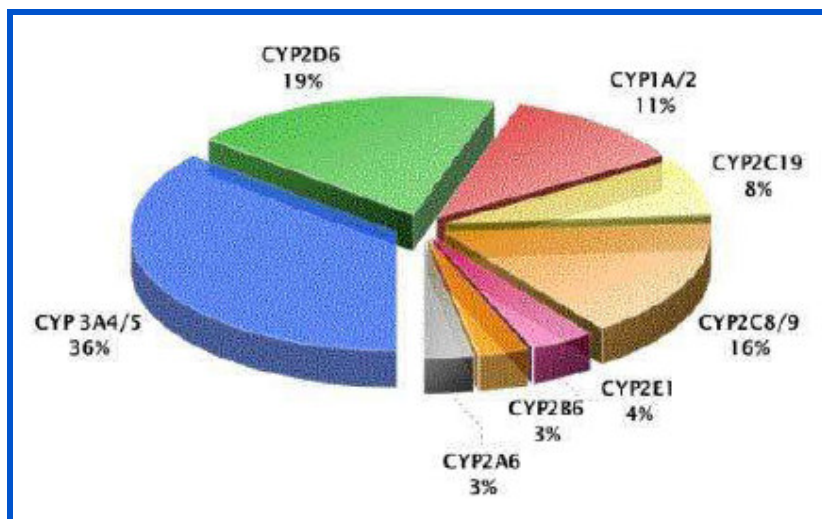
Tra i CYP450, quelli di maggior rilievo sono sicuramente il CYP3A4, il CYP2D6 e il CYP2C19 (Murray and Petrovic, 2006). Quest'ultimo, in particolare, è responsabile del metabolismo di circa il 5-10% dei farmaci attualmente in commercio, tra cui benzodiazepine, antiepilettici, SSRI, antidepressivi e barbiturici. Il gene è particolarmente polimorfico ed ad oggi sono state identificate 25 varianti alleliche di questo gene, denominate da \*1 a \*25; tra queste ve ne sono alcune che comportano la produzione di proteine completamente inattive (ad es: \*2-8) e altre che codificano per enzimi con un'aumentata attività catalitica (es CYP2C19\*17).

Tra le sette varianti alleliche che diminuiscono l'attività di questo citocromo e che rendono l'individuo "*Poor Metabolizer*" (PM), le più comuni sono il CYP2C19\*2, presente nel 75-85% degli asiatici e in

circa il 15% degli europei, e il CYP2C19\*3, presente nel 6-10% degli asiatici e raro negli europei ed afro-americani. Anche in questo caso, la conoscenza dei polimorfismi è utile nella scelta del tipo di farmaco oppure nel dosaggio dello stesso al fine di ottenere il miglior effetto terapeutico ed evitare spiacevoli reazioni avverse.

L'attività enzimatica del CYP2C19 è tuttavia influenzata anche dalla dieta e dall'assunzione di farmaci. Fattori che complicano la correlazione genotipo/fenotipo sono, infatti, i fenomeni dell'induzione/repressione enzimatica e dell'interazione tra farmaci. L'enzima CYP2C19 è un enzima inducibile, pertanto l'assunzione inconsapevole, attraverso la dieta, di determinati xenobiotici può alterare l'espressione del gene in modo da far aumentare il livello di proteina e quindi della capacità di metabolizzare i farmaci substrato dell'enzima. Un esempio pratico di ciò riguarda l'efficacia del Clopidogrel. Il Clopidogrel è un farmaco utilizzato in combinazione con l'Aspirina per il trattamento e la prevenzione della trombosi dello stent in apzienti sottoposti ad interventi coronarici percutanei per sindrome coronarica acuta. L'effetto del trattamento però non è uniforme in tutti, dal momento che circa un quarto degli individui mostra una risposta subterapeutica dovuta in gran parte a geni che governano l'uptake ed il metabolismo del farmaco. Il Clopidogrel è, infatti, un pro-farmaco inattivo che deve essere ossidato da citocromi epatici per produrre un metabolita attivo; di conseguenza i portatori di alleli ipofunzionali CYP2C19 hanno riduzione del livello del

farmaco attivo e aumento di aggregazione piastrinica, rischio di morte cardiovascolare e trombosi dello stent coronarico (Mega JL et al., 2009). Proprio i recenti progressi nella farmacogenetica delle tienopirimidine (Clopidogrel, Ticlopidina, Prasugrel) aprono la prospettiva realistica di una scelta personalizzata dell'agente antiplastrinico più adatto da usare e per il dosaggio individualizzato.



*Figura 10: grafico a torta della proporzione di farmaci metabolizzati dagli enzimi P450  
(Tratto da Wrington SA et al., 1992).*

## 1.7 Tecniche diagnostiche

Negli ultimi anni si è assistito ad un rapido sviluppo sia delle tecniche che degli strumenti volti ad indagare il profilo mutazionale di geni con un ruolo chiave nello sviluppo di alcune patologie ad alta incidenza o mortalità come tumori, malattie psichiatriche e patologie

neurodegenerative. Attualmente accanto alle procedure sviluppate autonomamente in laboratorio si stanno affiancando un numero sempre maggiore di kits commerciali basati su procedure standardizzate e appropriati controlli. La maggior parte di questi sfrutta metodiche di Real Time PCR o varianti di questa, che presentano da un lato il vantaggio di una maggiore sensibilità e rapidità rispetto alla PCR/sequenza ma dall'altro un costo relativamente elevato che ne limita l'applicazione su larga scala.

In generale le tecniche utilizzate a scopo di screening diagnostico e con ricadute sulla farmacogenetica vengono suddivise in metodi diretti e indiretti a seconda che siano in grado di identificare in modo preciso il tipo di mutazione o ne mettano semplicemente in luce presenza senza individuarne la natura.

### **1.7.1 Metodi di screening diretti**

#### *a. Sequenziamento*

Il sequenziamento del prodotto di PCR secondo il metodo di Sanger è un metodo di screening diretto che consente di conoscere in modo puntuale la successione in basi di un tratto genomico amplificato mediante PCR. Mentre in passato il sequenziamento veniva condotto con l'ausilio di isotopi radioattivi, attualmente la marcatura più utilizzata è quella che prevede l'utilizzo di terminatori di catena (*big dye terminators*) rappresentati dai quattro dideossinucleotidi marcati

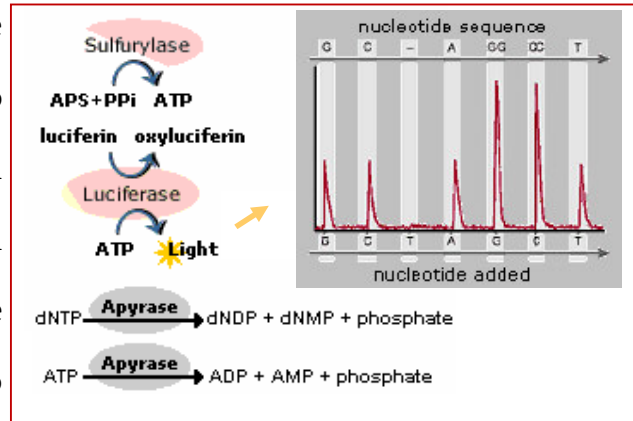
con molecole fluorescenti. I prodotti della marcatura vengono sottoposti ad elettroforesi capillare su apparecchiature automatizzate e ad alta processività collegate ad un laser per l'eccitazione dei fluorocromi e a un detector per la rilevazione della luce emessa. Le emissioni di luce vengono raccolte ed analizzate da una fotocamera digitale CCD (*Coupled Charge Device*) la quale trasferisce la sequenza delle emissioni in un grafico (elettroferogramma) costituito dalla successione di picchi di quattro differenti colori, ciascuno corrispondente all'emissione fluorescente di uno dei quattro fluorocromi. Il sequenziamento diretto è la tecnica sicuramente più diffusa e rappresenta il gold standard per evidenziare mutazioni puntiformi o frameshift, tuttavia non è quella in assoluto più sensibile; difficilmente una mutazione può essere evidenziata se presente in meno del 20% delle molecole di DNA analizzate.

### ***b. Il Pyrosequencing***

Il Pyrosequencing è sicuramente la tecnica più innovativa ed è molto diffuso in quasi tutti gli Ospedali di eccellenza italiani. Il Pyrosequencing è un metodo di sequenziamento del DNA, realizzato appositamente per studiare gli SNPs (mutazioni puntiformi o polimorfismi a singolo nucleotide). Gli SNPs costituiscono il 90% delle variazioni di sequenza umane e rivestono un ruolo cruciale come fattore predittivi di rischio nei confronti di certe malattie multifattoriali. Il metodo del Pyrosequencing si basa sul dosaggio del pirofosfato liberato in seguito all'attacco di un dNTP al filamento

polimerizzato. La tecnica consta di cinque passaggi principali. Nel primo passaggio la sequenza da analizzare, dopo essere stata amplificata, viene denaturata e incubata con gli enzimi DNA Polimerasi, ATP solforilasi, Luciferasi e Apirasi e con i substrati ASP (adenosinsolfosfato) e luciferina.

A questo punto viene aggiunto alla reazione uno dei quattro dNTP che verrà incorporato dalla DNA Polimerasi solo se complementare con il residuo



del template; se ciò è vero si avrà liberazione di P<sub>i</sub>

*Figura 11: schema del metodo di sequenziamento del DNA mediante Pyrosequenziamento*

(Pirofosfato inorganico), il quale verrà trasformato in ATP ad opera della solforilasi utilizzando l'ASP come substrato. L'ATP ottenuto consente la conversione della luciferina a ossiluciferina ad opera della luciferasi, concomitante alla produzione di un segnale luminoso che viene rilevato da un'apposita camera fotosensibile (CCD). L'enzima apirasi infine degrada il dNTP che non è stato incorporato e l'ATP in eccesso prodotto dalla solforilasi. Solo quando la degradazione è terminata, viene aggiunto un secondo dNTP per far progredire la reazione di polimerizzazione come descritto allo step 1 e così per tutti e quattro i dNTPs fino alla deduzione completa della sequenza. Per evitare falsi positivi, al posto dell'adenina si utilizza come dNTP

l'adenosina-tio-trifosfato. Il segnale luminoso è poi registrato in un apposito pirogramma in cui l'altezza e l'area di ogni picco sono proporzionali all'intensità dell'emissione luminosa e quindi alla quantità di ATP prodotto (Voelkerding et al., 2009).

In uno studio italiano presentato il 2 luglio scorso all'ESMO Conference: 12th World Congress on Gastrointestinal Cancer at CCIB a Barcellona si è evidenziato il ruolo sempre più importante di tale metodica negli studi di farmacogenetica e in particolar modo nella predittività di risposta ai farmaci inibitori di EGFR (recettore del fattore di crescita dell'epidermide) nei pazienti con carcinoma del colon in fase avanzata (De Maglio et al., 2010). Lo studio ha analizzato centinaia di casi di pazienti affetti da carcinoma del colon metastatico, in cui sono state ricercate specifiche mutazioni di K-RAS e di B-RAF sul tumore primitivo e sulle metastasi. La valutazione di queste mutazioni è stata condotta grazie al Pyrosequencing e a kit specifici marcati CE-IVD. I risultati ottenuti hanno evidenziato che il 57% dei tumori e delle metastasi dei pazienti studiati, aveva una mutazione in K-RAS o in B-RAF, rendendo così la terapia con farmaci biologici anti-EGFR inutile, costosa e comunque non efficace. La maggiore frequenza di mutazioni rilevata in questo studio rispetto ad altri rifletterebbe una particolare sensibilità del metodo di sequenziamento suggerendo come la tecnologia Pyrosequencing rappresenti una promettente tecnologia, ampiamente affidabile e altamente sensibile, facilmente implementabile nella routine clinica di

laboratorio, anche per la sua semplicità di utilizzo e per la rapidità di esecuzione complessiva dei test (2,5 giorni).

*c. Amplification Refractory Mutation System (ARMS)*

Questa metodica identifica sostituzioni nucleotidiche e piccole delezioni o inserzioni e consiste nell'amplificazione del DNA mediante PCR utilizzando oligonucleotidi complementari alla sequenza normale e mutata. Per ogni campione si eseguono pertanto due amplificazioni, una con primers normali ed un'altra con primers mutati di modo che in presenza di mutazioni allo stato omozigote l'amplificazione avverrà solo con con primers mutati e viceversa mentre i soggetti eterozigoti per la mutazione amplificheranno il loro DNA in entrambe le condizioni. Una variante a questa tecnica è rappresentata dalla "ARMS multipla" che utilizza più primers mutati in un'unica reazione. Questa tecnica consente di studiare un soggetto per più mutazioni ed è utilizzata correntemente per l'analisi molecolare della talassemia e della fibrosi cistica.

*d. Combined Real Time Polymerase Chain Reaction and ARMS*

La Real Time PCR rappresenta un'evoluzione della tecnica PCR end-point rispetto alla quale consente di effettuare un'analisi oltre che qualitativa anche quantitativa del DNA di partenza e di ridurre le manipolazioni post-amplificazione. Il termine Real Time deriva dal fatto che tale metodo misura l'amplificazione durante la fase esponenziale della PCR, quando cioè l'efficienza di amplificazione è

influenzata minimamente dalle variabili di reazione, permettendo di ottenere risultati molto più accurati rispetto alla PCR tradizionale end-point in cui la valutazione viene effettuata al termine della reazione di amplificazione.

La PCR Real-Time può essere effettuata con due differenti chimiche di reazione; la prima vede l'utilizzo di coloranti fluorescenti che si intercalano in modo aspecifico nella doppia elica del DNA amplificato, la seconda vede invece l'utilizzo di sonde fluorescenti specifiche per il tratto di DNA da amplificare. Esistono diversi tipi di sonde (sonde dual-labeled, sonde fret, molecular beacons e scorpion probe) che si differenziano sostanzialmente per il meccanismo di emissione della fluorescenza. Nella Real-Time con sonde dual-labeled o TaqMan l'emissione di fluorescenza dipende dall'attività esonucleasica 5'>3' della DNA Polimerasi che va a idrolizzare la sonda, consentendo l'emissione di fluorescenza da parte del reporter (in posizione 5' del probe), prima schermata dal quencher presente in posizione 3' della sonda. Le sonde fret funzionano in modo esattamente opposto in quanto l'emissione di fluorescenza è subordinata al legame di due sonde (marcate con un solo fluorocromo) in posizione adiacente sulla sequenza di DNA amplificato, di modo che l'emissione del fluoroforo di una sonda eccita il fluoroforo adiacente permettendo il trasferimento di energia tra i due fluorofori e la produzione di un segnale fluorescente che viene rilevato. Nel caso delle sonde molecular beacons, il reporter e il

quencher si trovano ciascuno in posizione 5' e 3' dell'oligonucleotide le cui estremità sono disegnate in modo da essere complementari tra loro a formare un loop. Quando la sonda è libera in soluzione, il reporter e il quencher si trovano appaiati e non si ha emissione di fluorescenza. Nella fase di annealing di ciascun ciclo di PCR, la forcina si lega alla sequenza bersaglio determinando l'allontanamento del quencher dal reporter e quindi l'emissione di fluorescenza. La sonda Scorpion deriva dalla fusione di una sequenza primer con una sonda corrispondente ad un duplex di DNA, marcato alle due estremità rispettivamente con una molecola quencher e con un fluoroforo e separato dal primer da un gruppo bloccante la PCR che impedisce alla DNA Polimerasi di copiare il probe. Al procedere della reazione di PCR, il probe si apre e la sequenza specifica del probe forma un'ansa che è in grado di legare una sequenza complementare all'interno del filamento di DNA di nuova sintesi; come una sonda Molecular Beacons, l'ibridazione fa allontanare il reporter dal quencher e permette un'emissione di fluorescenza misurabile. Attualmente sul mercato, sono disponibili kit commerciali basati su questa metodica per la dimostrazione di mutazioni del gene kras nei codoni 12 e 13; uno di essi è il kit TheraScreen di Roche che implementa la metodica della Real Time a quella ARMS riuscendo così a effettuare una precisa genotipizzazione del DNA di partenza.

*e. Metodica "Reverse Dot Blot"*

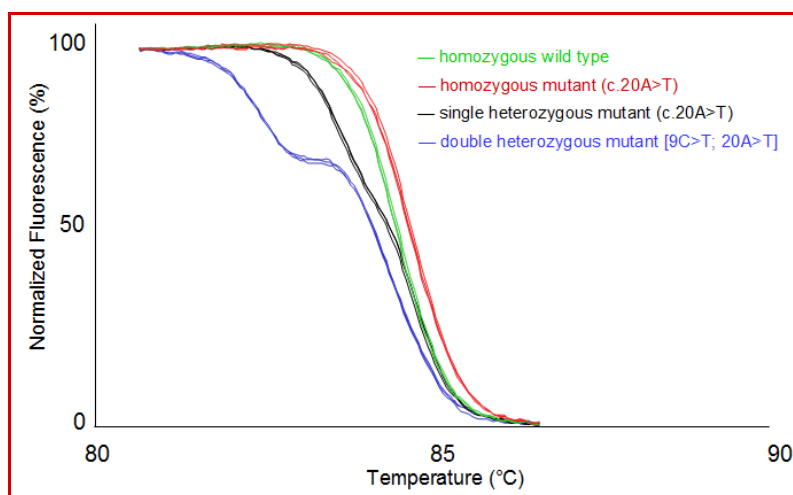
Con il termine di Reverse Dot-Blot si intende quella tecnica attraverso la quale vengono trasferite su matrice solida (nitrocellulosa e/o nylon) piccole molecole di DNA, dell'ordine di poche centinaia di basi. Di solito questa tecnologia viene impiegata per immobilizzare sonde oligonucleotidiche di circa 20 pb che, in una fase successiva, vengono ibridate con una regione genomica specifica precedentemente amplificata mediante PCR (Polimerase Chain reaction). Utilizzando oligonucleotidi corrispondenti a mutazioni note, è possibile quindi capire se un individuo porti o meno una certa mutazione. Per poter evidenziare l'ibridazione tra le sequenze complementari di oligonucleotidi e di amplificati, l'amplificazione è condotta in presenza di un desossiribonucleotide (dUTP) biotinilato che al termine dell'ibridazione viene riconosciuto e legato da un complesso streptoavidina-fosfatasi alcalina. In ambiente alcalino e in presenza di un substrato cromogeno (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato, BCIP e nitroblu tetrazolio cloruro, NBT), l'enzima catalizza la reazione di idrolisi del BCIP determinando la formazione di un composto colorato che riduce l'NTB in NTB formazano, di colore blu intenso.

## 1.7.2 Metodi di screening indiretti

### *a. High Resolution Melting (HRM)*

L'analisi HRM è utilizzata come metodo di screening per la detezione, in amplificati genomici, di mutazioni nucleotidiche, polimorfismi e differenze epigenetiche. Il metodo HRM risulta particolarmente adatto ad effettuare analisi di genotipizzazioni (gene-scanning) su larga scala, in quanto è in grado di caratterizzare campioni di acido nucleico, con estrema accuratezza e in tempi rapidi. La tecnica si basa sull'analisi della curva di melting o di dissociazione di prodotti di amplificazione, dalla cui particolare sequenza dipende la forma e l'andamento della curva stessa. Analizzando quindi il profilo di dissociazione del dsDNA, al variare della temperatura, diventa possibile discriminare e caratterizzare sequenze di DNA che differiscono anche per una singola base.

Rispetto ad altri metodi molto laboriosi o costosi, l'HRM non richiede la costruzione di primers allele-specifici o sonde sequenza-complementari ma si serve di marcatori intercalanti fluorescenti (SYBR® Green 1, SYTO®9, Eva Green™ etc.) utilizzati comunemente nel sistema di Real Time PCR; la tecnica risulta pertanto facilmente implementabile nei laboratori diagnostici già esistenti e la semplicità operativa del metodo la renderà sicuramente il principale strumento di analisi molecolare.



**Figura 12:** curve di melting dell'analisi HRM di sequenze wild-type (verde), mutante omozigote per la mutazione c.20A>T (rossa), mutante eterozigote per la mutazione c.20A>T (nero) e doppio mutante eterozigote per le mutazioni 9C>T e 20A>T. In ascissa è riportata la temperatura in gradi centigradi mentre in ordinata è riportato il segnale di fluorescenza normalizzato.

### ***b. Analisi Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)***

L'SSCP è una tecnica dotata di buona sensibilità (>85%), semplicità di esecuzione e basso costo che permette di valutare la presenza di mutazioni puntiformi, in una sequenza di DNA precedentemente amplificata, di cui non è nota a priori la localizzazione. La metodica consiste in una corsa elettroforetica di prodotti di PCR e si basa sul principio che brevi frammenti di DNA (di lunghezza < 300bp), a singolo filamento e in condizioni non denaturanti, assumono differenti conformazioni tridimensionali dipendenti da interazioni intramolecolari che a sua volta sono funzione della loro sequenza nucleotidica. Siccome dalla conformazione e dalle dimensione di una

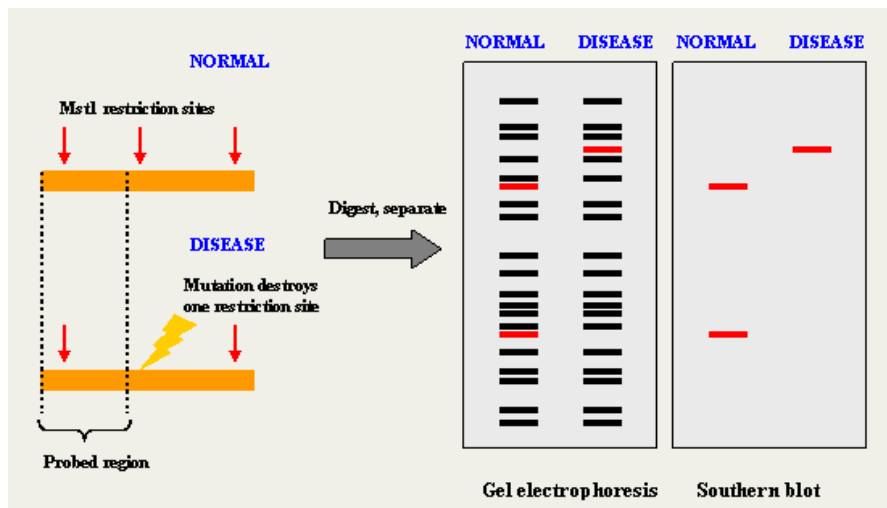
molecola, dipende la sua mobilità elettroforetica, frammenti genici che differiscono anche di una base soltanto presenteranno profili di migrazione elettroforetica differenti, se sottoposti a un campo elettrico su un gel di poliacrilammide non denaturante. A primo avviso l'SSCP rappresenta una tecnica molto semplice e intuitiva; in realtà la capacità di evidenziare differenze nucleotidiche tra due sequenze di DNA è fortemente dipendente da una serie di parametri strumentali come la concentrazione di acrilamide del gel, la potenza applicata agli elettrodi, la temperatura e la forza ionica, per cui è necessario standardizzare la procedura operativa per ogni tipo di sequenza analizzata prima di poter procedere allo screening mutazionale. Tale limite ha notevolmente ridotto l'applicabilità su larga scala dell'SSCP sebbene di recente siano stati costruiti apparecchi dedicati a tale tipo di analisi in grado di mantenere costanti e di regolare tutti i parametri fondamentali.

### *c. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)*

In biologia molecolare con il termine RFLP si indicano quei polimorfismi, quindi quelle variazioni nella sequenza del DNA, relativi alla presenza di specifici siti di restrizione tali per cui, in seguito alla digestione del DNA con specifiche endonucleasi di restrizione, risulta un pattern di frammenti di differenti lunghezze che può essere utilizzato per distinguere gli individui tra loro. Gli RFLP rappresentano quindi dei marcatori genetici da utilizzarsi sia

per la mappatura del genoma, andando a individuare prima la disposizione dei siti di restrizione e poi la localizzazione dei geni di interesse, sia per l'analisi delle variazioni della sequenza nucleotidica stessa in quanto cambiamenti del pattern elettroforetico dei frammenti sono testimonianza di riarrangiamenti del DNA capaci di alterare determinati siti di restrizione.

La procedura di analisi degli RFLP prevede che i frammenti di DNA, ottenuti dalla digestione con uno o più enzimi di restrizione, vengano poi separati in gel d'agarosio mediante elettroforesi e infine visualizzati ai raggi X sfruttando l'ibridizzazione con delle sonde marcate con radioisotopi, le cosiddette RFLP probes, complementari a uno o più frammenti di DNA.



*Figura 13: esempio di applicazione dell'RFLP all'analisi di variazioni della sequenza nucleotidica per mezzo del confronto del pattern elettroforetico tra un individuo sano e uno malato.*

In campo medico-diagnostico la procedura ha vaste applicazioni, dai test di paternità fino alla diagnosi dei portatori di geni malattia sebbene la laboriosità della metodica e la necessità di impiegare sonde radiomarcate abbiano limitato notevolmente il suo utilizzo su larga scala. Per ovviare a tali inconvenienti, si sono sviluppate delle varianti dell'RFLP caratterizzate da maggior rapidità di esecuzione e sensibilità. Una di queste è la Cleved Amplified Polymorphic Sequence (CAPS) in cui si supera il problema dell'isolamento di una quantità sufficiente di DNA, antepoendo alla digestione enzimatica l'amplificazione della sequenza di interesse. La tecnica però può anche essere sfruttata come metodo di screening di mutazioni, scegliendo per esempio un'endonucleasi di restrizione che riconosca una sequenza presente nella forma wild type e non nelle varianti alleliche del gene, in modo che dal pattern di frammenti ottenuti dalla digestione della sequenza di interesse amplificata, sia possibile dedurre lo stato mutazionale del gene.

La tecnica in ogni caso rappresenta un metodo di screening indiretto pertanto è necessario affiancarla ad un metodo diretto, quale il sequenziamento, per identificare con precisione il tipo di mutazione che ha determinato la perdita del sito di restrizione. Un ulteriore limite della metodica riguarda l'applicabilità limitata in quanto solo quei geni le cui mutazioni note cadono in corrispondenza di un sito di restrizione possono essere analizzati.

### **1.7.2.1 Metodi di screening ad alta sensibilità**

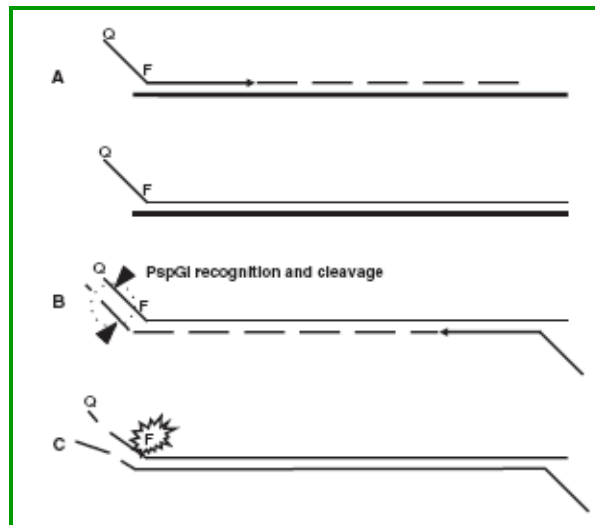
I metodi di screening ad alta sensibilità comprendono una serie di metodiche estremamente sensibili, in grado di evidenziare mutazioni geniche presenti in una minuta sottopopolazione cellulare, come può essere una specifica subpolazione tumorale all'interno di una massa tumorale eterogenea. Lo sviluppo di queste tecniche è stato determinato, infatti, dalla necessità di dimostrare la presenza di mutazioni geniche in rare cellule neoplastiche frammiste a numerose cellule normali, ad esempio cellule neoplastiche presenti nel circolo sanguigno o in secrezioni corporee e gli ambiti di applicazione principali sono la diagnostica precoce delle neoplasie e il follow-up del paziente neoplastico. Durante la chemioterapia ma soprattutto nel follow-up post trattamento è di cruciale importanza riuscire a evidenziare anche poche cellule tumorali con specifiche mutazioni in grado di conferire resistenza al trattamento farmacologico perché tali cellule sono selezionate dal trattamento e col progredire della neoplasia andranno a costituire la maggior quota parte delle cellule tumorali. L'efficacia terapeutica e la sopravvivenza del paziente trattato dipendono quindi fortemente dai mezzi che si hanno a disposizione per la diagnosi precoce di cellule tumorali primitive con mutazioni conferenti resistenza. Fra le metodiche ad altissima sensibilità le più usate sono la Fluorescent Amplicon Generation (FLAG) e la Mutant Enriched PCR; entrambe richiedono la conoscenza a priori del sito di mutazione e pertanto si prestano

all'analisi di mutazioni note o concentrate in hot spots mutazionali. Un esempio di applicazione di questi due metodi è l'analisi delle mutazioni del gene K-ras che, nei tumori colon-rettali, conferiscono resistenza agli anticorpi monoclonali anti EGFR, sebbene allo stato attuale manchi ancora una standardizzazione che ne consenta l'utilizzo al di fuori dell'ambito di ricerca.

*a. Fluorescent Amplicon Generation Assay*

Si tratta di una tecnica sviluppata recentemente per l'analisi del gene K-ras che consente di evidenziare mutazioni geniche anche in presenza di un eccesso di sequenze normali. La metodica combina due tecniche: l'amplificazione in Real-Time e la digestione enzimatica, consentendo da un lato di monitorare l'amplificazione in tempo reale e dall'altro di individuare con precisione il tipo di alterazione nucleotidica. Come visto per mutant enriched PCR anche la FLAG prevede l'amplificazione della regione di interesse con un primer (A) disegnato in modo da creare un sito di restrizione, riconosciuto dalla endonucleasi di restrizione PspG1, nel DNA normale ma non in quello mutato. Siccome tale enzima è termostabile la digestione avviene durante la reazione di PCR, non appena si verifica l'estensione dei primers e si crea il sito di restrizione specifico e interessa solo il frammento normale che non contiene la mutazione. Di conseguenza si ottiene un'amplificazione selettiva della sequenza mutata a cui si associa un'emissione di fluorescenza proporzionale

alla quantità di amplificato grazie a una doppia marcatura in 5' del primer (A) ad opera di un fluoroforo e di una molecola quencher che viene idrolizzata col procedere dell'amplificazione e della digestione.



**Figura 14:** rappresentazione schematica degli steps principali di cui si compone la tecnica FLAG. **A:** il primer forward possiede una coda (TAG) contenente un sito di riconoscimento per una endonucleasi di restrizione e marcata sia con un quencher (Q) che con un fluoroforo (F). **B:** durante l'estensione dei primers, la coda diventa a doppio filamento così da rendere disponibile il sito di restrizione al riconoscimento e al taglio da parte dell'enzima di restrizione. **C:** la digestione consente l'emissione di fluorescenza, prima schermata dal quencher, da parte del fluoroforo.

### ***b. Polymerase Chain Reaction arricchita per la sequenza mutata***

Tale metodica consiste in una doppia amplificazione della sequenza di interesse. La prima PCR utilizza primers disegnati opportunamente per essere parzialmente complementari alle due estremità di un frammento genico contenente il codone mutato e per

generare un sito di restrizione (BstN1) solo se l'allele non è mutato. Di conseguenza se l'allele è mutato, non si formerà alcun sito di restrizione e a seguito di una prima digestione enzimatica con l'endonucleasi appropriata si otterranno, nel caso del portatore della mutazione, dei frammenti di dimensione differente. La seconda PCR utilizza primers complementari al frammento contenente la mutazione in modo che con la seconda amplificazione si ottiene un arricchimento marcato del frammento mutante rispetto al wild-type. Al termine della seconda PCR si procede con una seconda digestione enzimatica che permette di selezionare ulteriormente le molecole mutate rispetto a quelle normali. I frammenti sono poi visualizzabili in gel d'agarosio. La sensibilità della metodica è talmente elevata da permettere di identificare 1 molecola mutata su 1000-10.000 molecole.

## 2 Materiali e Metodi

### 2.1 Selezione del campione

#### *a. Gene K-RAS*

Il materiale biologico per l'estrazione del DNA e l'analisi dello stato mutazionale di K-ras è rappresentato da tessuto prelevato da carcinoma infiltrante primitivo del colonretto o metastatico e il campione è disponibile sotto forma di piccole biopsie esplorative di tessuto neoplastico asportato con l'intervento chirurgico. Siccome la lesione tumorale si presenta frequentemente come un tessuto eterogeneo, comprendente accanto ad aree di carcinoma infiltrante, aree di necrosi, flogistiche e componenti normali, è importante che il prelievo sia circoscritto all'area neoplastica perché la possibilità di individuare mutazioni geniche risente notevolmente della percentuale di cellule mutate nel campione e quindi delle caratteristiche dell'area di tessuto destinata all'analisi molecolare. Tali caratteristiche devono essere valutate attentamente, prima dell'estrazione del DNA, dall'Anatomo Patologo che dovrà eventualmente provvedere a selezionare le aree tumorali mediante dissezioni o microdissezioni; infatti, ai fini della corretta riuscita dell'esame è fondamentale che la percentuale di cellule di carcinoma infiltrante, nel tessuto da sottoporre all'esame molecolare, non sia inferiore al 70% in quanto la sensibilità delle tecniche diagnostiche non supera l'80%.

In questo lavoro si è utilizzato come materiale di partenza del tessuto derivante da biopsia.

*b. Gene HLA*

Per verificare la presenza dell'allele HLA-B\*57:01, il campione di partenza è rappresentato dal sangue intero.

## **2.2 Raccolta, manipolazione e pretrattamento del campione**

*a. Gene K-RAS*

Una volta effettuato il prelievo, il tessuto può essere processato immediatamente, oppure dopo congelamento a -80°C o ancora dopo fissazione in formalina ed inclusione in paraffina. Il congelamento rappresenta sicuramente la procedura più auspicabile, tuttavia la sua scarsa diffusione in ambito clinico ha portato a scegliere, come procedura di manipolazione del campione, l'inclusione in paraffina. L'utilizzo di tessuti paraffinati presenta il grosso inconveniente di fornire DNA di qualità decisamente inferiore a quella ottenibile da tessuti freschi o congelati, ma comunque sufficiente per le analisi molecolari.

A partire dal tessuto incluso si sono ottenute al microtomo 3-5 sezioni di 20µm che sono state essiccate su vetrino e sottoposte a una macrodissezione tissutale. Tale procedura serve a arricchire il

materiale da analizzare con cellule neoplastiche e viene condotta dall'anatomo patologo dopo un attento esame istopatologico del medesimo preparato su sezione da 4 micron colorato con ematossilina-eosina. Le aree che dall'esame istopatologico risultano interessanti vengono delimitate con un pennarello e successivamente confrontate con le sezioni "in bianco" da 20 micron adese al vetrino che vengono quindi opportunamente dissezionate con la lama di un bisturi. Il tessuto dissezionato è stato quindi raccolto in un tubo Eppendorf, sottoposto a sparaffinatura in appropriato solvente (xilolo), lavato in alcool e disidratato prima di iniziare l'estrazione.

#### ***b. Gene HLA***

Il sangue deve essere trattato esclusivamente con EDTA in quanto altri coagulanti, come ad es. l'eparina, sono potenti inibitori della TAQ polimerasi e potrebbero quindi alterare l'efficienza della reazione di amplificazione. Il sangue fresco può essere conservato per breve tempo a +2°/+8°C oppure congelato a -20°C se non si procede subito con l'estrazione del DNA.

## **2.3 Estrazione e Conservazione del DNA**

#### ***a. Gene K-RAS***

Per l'estrazione e la purificazione del DNA da tessuto paraffinato sono oggi disponibili vari kits commerciali, in genere basati sul principio della cromatografia. L'utilizzo di tali kits offre numerosi

vantaggi; in particolare essi garantiscono la standardizzazione della procedura e consentono di accorciare di molto i tempi tecnici della purificazione rispetto alla metodica classica che prevede l'estrazione in fenolo-cloroformio e la purificazione mediante precipitazione in alcool. Le proposte commerciali sono differenziate in funzione del tipo di campione da utilizzare, tessuto congelato o fissato e incluso in paraffina, e sono corredate di protocolli di semplice esecuzione. Nel caso in esame è stato utilizzato il kit QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) che arriva a purificare in media di 30 µg di DNA totale a partire da 25 mg di tessuto e prevede l'utilizzo di colonnine cromatografiche dotate di una membrana a base di silice specifica per il legame con il DNA. La procedura QIAamp non richiede la rottura meccanica del campione di tessuto e l'omogenizzazione tissutale sarebbe funzionale solo a ridurre il tempo di lisi cellulare che rappresenta il primo step della procedura di purificazione ed è essenziale ai fini del rilascio del DNA. La lisi è stata condotta usando tamponi contenenti l'agente denaturante SDS (sodio-dodecilsolfato) e l'enzima proteinasi K che digerisce le proteine della membrana plasmatica e gli istoni. Siccome il tessuto di partenza era particolarmente attivo da un punto di vista trascrizionale si è reso opportuno eliminare gli acidi ribonucleici trattando il campione con un buffer contenente RNAasi. Al campione è stato poi aggiunto un buffer contenente etanolo e la soluzione ottenuta è stata fatta passare attraverso una colonnina cromatografica in modo da separare la componente organica, che filtra attraverso al

membrana e si ritrova nel fondo della colonnina, dalla componente acquosa contenente il DNA che rimane legato alla membrana. È seguita una fase di lavaggio per eliminare dalla membrana eventuali impurità e residui e infine il DNA è stato eluito attraverso un opportuno buffer di eluizione. Una volta estratto, il DNA è stato risospeso in tampone adeguato, quindi valutato sotto il profilo qualità/quantità o mediante lettura spettrofotometrica e infine congelato a -80°C.

#### ***b. Gene HLA***

Il DNA è stato estratto dal sangue fresco utilizzando il kit QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN). Il kit prevede l'utilizzo di diverse soluzioni, da impiegare in successione, secondo una serie di passaggi del tutto simili a quelli visti nel paragrafo 2.3a. Il sangue è stato inizialmente trattato con l'enzima Proteinasi K per digerire le proteine e quindi contribuire a disgregare le membrane cellulari. Le membrane plasmatiche e quelle nucleari delle cellule linfocitarie sono state poi distrutte in modo definitivo trattando il campione dapprima con una soluzione detergente e poi con etanolo (96-100%). Facendo passare la soluzione così ottenuta attraverso una colonnina cromatografica, si è fatto aderire il DNA a una membrana a base di silice presente nella colonnina e altamente affine agli acidi nucleici. Dopo avere lavato la membrana con un'apposito buffer di lavaggio, il DNA è stato infine eluito e valutato allo spettrofotometro per l'analisi

quantitativa. La purificazione è stata considerata conforme agli standard quando la quantità di DNA estratto è dell'ordine di 3-12µg/µl.

## **2.4 Progettazione dei primers**

In questo lavoro di tesi si sono costruite due coppie di primers per l'amplificazione dell'esone 1 del gene K-ras e altre quattro coppie di primers per l'amplificazione specifica dell'allele HLA-B\*57:01 e degli alleli B\*57 correlati.

I primers sono stati progettati avvalendosi dei programmi Primer3 v0.4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) e Olygo Analyzer v1.0.2.

Primer3 v0.4.0 è una risorsa on-line gratuita in grado di costruire più coppie di primer a partire da una sequenza target scelta dall'operatore. L'operatore, inoltre, può modificare diversi parametri (lunghezza dell'amplificato e dei primers, temperatura di annealing etc.) in modo da selezionare la coppia di primers che garantisca l'ottimale amplificazione della sequenza bersaglio. Olygo Analyzer v1.0.2 è un programma in grado di valutare sia l'esistenza di regioni di auto-annealing che la formazione di dimeri tra primers che potrebbero precludere la reazione di PCR. Oltre a ciò il programma rileva eventuali siti di appaiamento interni alla sequenza bersaglio che potrebbero portare alla produzione di sequenze inattese durante l'amplificazione. Una volta costruiti i primers, questi sono stati esportati in Human Genome Browser (BLAT) in modo da verificare

che l'appaiamento fosse specifico cioè unico nel genoma e nella posizione attesa e i primers non cadessero in corrispondenza di SNPs ed elementi interspersi del genoma come LINE e SINE.

## **2.5 Amplificazione di sequenze specifiche di DNA mediante PCR (*Polimerase Chain Reaction*)**

La PCR (Polymerase Chain Reaction) è una metodologia che permette l'amplificazione specifica ed esponenziale di sequenze di DNA di lunghezza variabile a partire da una quantità esigua del DNA in esame. La specificità si deve all'utilizzo di corte sequenze nucleotidiche (15-30 nt), detti primers, che si appaiano in maniera specifica su opposti filamenti di DNA delimitando la sequenza da amplificare. Essi, inoltre, fungono da innesco per la DNA Polimerasi che catalizza l'addizione di dideossinucleotidi al filamento nascente. La reazione di PCR si svolge in tre fasi: denaturazione, annealing ed elongazione e la ripetizione di queste per un numero di volte che va da 30 a 35 permette di aumentare in modo esponenziale la popolazione di sequenze di DNA di interesse amplificate. La sensibilità e la rapidità di esecuzione di questa tecnica l'hanno resa particolarmente adatta alla diagnostica di routine in laboratorio anche perché la PCR si presta ad essere eseguita a partire da DNA estratto da una vasta gamma di campioni biologici. Per

l'amplificazione dell'esone 1 del gene K-RAS si è utilizzato l'enzima AB Taq (AB Analitica) secondo il protocollo riportato in tabella 1. Per l'analisi dell'allele HLA-B\*57:01 è stata utilizzata la metodica PCR-SSP (*PCR-Sequence Specific Primers*) che prevede l'utilizzo di coppie di primers perfettamente complementari solo con un allele o con un gruppo di alleli, di modo che in condizioni di PCR rigidamente controllate si verifichi l'amplificazione della sequenza bersaglio solo in presenza della sequenza di interesse. Nel caso in esame sono state condotte quattro PCR-SSP, di cui tre finalizzate a rilevare la presenza di alleli B\*57 correlati e una rivolta all'identificazione di uno SNP (rs2395029), presente nel gene della proteina HCP-5, in forte *linkage disequilibrium* con l'allele B\*57:01 (Colombo S. *et al.*, 2008). Come controllo positivo di reazione è stato poi amplificato il gene delle  $\beta$ -globina. Le reazioni di PCR sono state riunite in due multiplex descritte in tabella 5.

<b>Programma di amplificazione gene K-RAS</b>	
Hot start	94°C – 5 minuti
Denaturazione	94°C – 1 minuto
Annealing	55°C – 1 minuto
Estensione	72°C – 1 minuto
Estensione finale	72°C – minuti
Stabilizzazione	15°C – 15 minuti

35  
cicli

**Tabella 1:** Programma di amplificazione dei codoni 12 e 13 del gene K-RAS.

<b>Programma di amplificazione allele B*57:01</b>		
Hot start	95°C – 5 minuti	
Denaturazione	95°C – 20 secondi	10 cicli
Annealing/Estensione	65°C – 1 minuto	
Denaturazione	95°C – 30 secondi	25 cicli
Annealing	60°C – 30 secondi	
Estensione	72°C – 30 secondi	
Estensione finale	72°C – minuti	
Stabilizzazione	15°C – 15 minuti	

*Tabella 2: Programma di amplificazione degli alleli HLA-B\*57 correlati e dell'allele HLA-B\*57:01.*

<b>Miscela di reazione AB Taq</b>	
DNA (50 ng/μl) o Plasmide (10 <sup>6</sup> C/ μl)	2 μl o 3 μl
dNTPs (2mM)	10 μl
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	4 μl
Buffer 10X	10 μl
Glicerolo 50%	10 μl
Primer F + R (35 pmoli/ μl)	0,3 μl + 1 μl
AB Taq (5U/μl)	0,5 μl
H <sub>2</sub> O milli-Q	12,2 μl o 11,2 μl
Volume finale	50 μl

*Tabella 3: condizioni utilizzate nelle reazioni di amplificazione con AB Taq dei codoni 12 e 13 del gene K-RAS. Per l'allestimento delle prove di sensibilità si sono utilizzati 3 μl di plasmide diluito 10<sup>6</sup>C/ μl.*

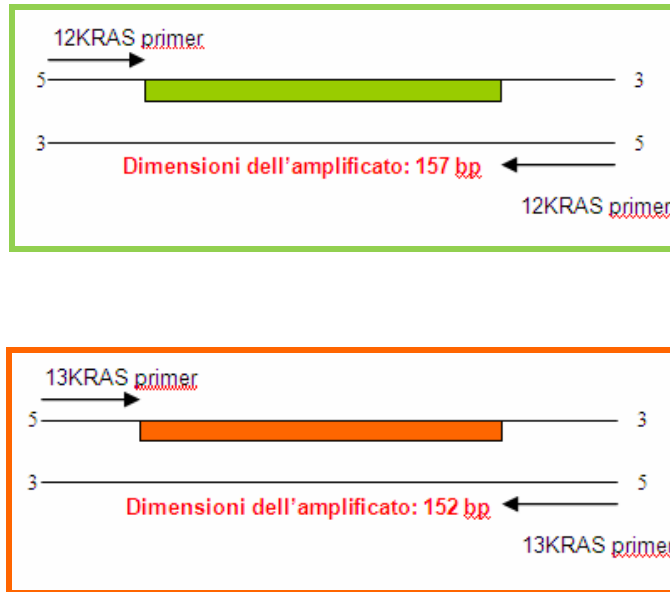
<b>Miscela di reazione AB SuperTaq</b>	
DNA (50 ng/ $\mu$ l)	3 $\mu$ l
dNTPs (20mM)	1 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	0,75 $\mu$ l
Buffer 10X	2,5 $\mu$ l
Primer 1F + 1R (10pmoli/ $\mu$ l)	2 $\mu$ l + 2 $\mu$ l
Primer 2F + 2R (10pmoli/ $\mu$ l)	0,5 $\mu$ l + 0,5 $\mu$ l
Primer 3F + 3R (10pmoli/ $\mu$ l)	2 $\mu$ l + 2 $\mu$ l
Primer 4F + 4R (10pmoli/ $\mu$ l)	2 $\mu$ l + 2 $\mu$ l
Primer 5F + 5R (10pmoli/ $\mu$ l)	2 $\mu$ l + 2 $\mu$ l
AB SuperTaq (5U/ $\mu$ l)	0,2 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O milli-Q	5,55 $\mu$ l
Volume finale	30 $\mu$ l

*Tabella 4: condizioni utilizzate nelle reazioni di amplificazione con AB Taq degli alleli HLA-B\*57 correlati e dell'allele HLA-B\*57:01. I primers 1,3 e 4 amplificano alleli HLA-B\*57 correlati; i primers 2 amplificano lo SNP rs2395029; i primers 5 amplificano il gene della  $\beta$ -globina.*

## 2.6 Elettroforesi in gel di agarosio

Il gel di agarosio consente di verificare l'avvenuta amplificazione delle sequenze di DNA di interesse e di ottenere indicazioni sia sulla quantità degli amplificati che sulla qualità degli stessi. Nel caso in esame è stato utilizzato un gel al 3% p/v, ottenuto sciogliendo la polvere di agarosio in un appropriato volume del buffer TAE 1X (Tris-Acetato 0,04 M, EDTA 10mM pH8), utilizzato anche per la corsa

elettroforetica. La porosità della matrice del gel è tale da consentire una separazione di frammenti dell'ordine di 100-3000 bp. Per testare i campioni in gel, una parte di essi è stata miscelata con il loading buffer Orange (30% Glicerolo, 10 mM EDTA, 0,25% Orange G) utilizzato sia per aiutare la deposizione degli amplificati sul fondo del pozzetto, sia per rendere visibile il fronte di migrazione nel gel durante la corsa elettroforetica. L'intensità del campo elettrico è stata impostata a 6 V/cm di lunghezza del gel, un valore che consente di ottenere una migrazione uniforme e relativamente veloce anche dei frammenti di dimensioni prossime al limite superiore del range di risoluzione in bp del gel. Per garantire la visualizzazione degli amplificati, nella soluzione di agarosio e TAE non solidificata è stato aggiunto, in rapporto 1/20.000 p/v (sul volume finale), Bromuro di Etidio (EtBr), una molecola intercalante di acidi nucleici in grado di emettere fluorescenza nel visibile se eccitato con luce di lunghezza d'onda di 300nm. Una volta posto il gel in un transilluminatore a luce UV, è possibile quindi visualizzare i frammenti di DNA amplificati sotto forma di bande fluorescenti. Assieme ai campioni sono stati caricati dei markers di peso molecolare noto per verificare se le bande degli amplificati corrispondessero alle dimensioni attese.



*Figura 15: amplificazione della sequenza di interesse mediante primers specifici per il gene k-ras e dimensioni attese degli amplificati nel caso del codone 12 e 13 del medesimo gene.*

Sequenza target		Dimensioni Attese degli Amplificati
Multiplex 1	Amplificazione BG ( $\beta$ -globina)	268 bp
	Amplificazione SNP_HCP-5	173 bp
	Amplificazione Allele 1_B*57 correlato	94 bp
Multiplex 2	Amplificazione BG ( $\beta$ -globina)	268 bp
	Amplificazione Allele 2_B*57 correlato	212 bp
	Amplificazione Allele 3_B*57 correlato	175 bp

*Tabella 5: riassunto delle dimensioni attese degli amplificati relativi alle sequenze dell'allele HLA-B\*57:01, degli alleli HLA-B\*57 correlati e del gene  $\beta$ -globina che funge da controllo positivo di PCR .*

## 2.7 Ligazione

Il vettore e i prodotti di amplificazione delle sequenze di interesse, digeriti con gli opportuni enzimi di restrizione, sono stati quantificati visivamente mediante elettroforesi su gel sottile di agarosio per confronto con una quantità nota di plasmide. Per la reazione di ligazione è stato utilizzato il kit di ligazione pGEM®-T EASY VECTOR di Promega secondo le modalità riportate nella tabella sottostante. La miscela di reazione è stata incubata per 15-16 ore a 16°C e poi conservata a -20°C fino al momento dell'utilizzo.

<b>Miscela di reazione di ligazione</b>	
2X Rapid Ligation Buffer, T4 DNA ligase	5 µl
pGEM®-T Easy vector (50 ng)	1 µl
Amplificato da PCR	X µl*
T4 DNA ligase (3 Weiss units/ul)	1 µl
H2O	Qb a 10 µl

*Tabella 6: protocollo di ligazione.*

\* La quantità di amplificato da inserire nella reazione di ligazione deve essere calcolato mediante la seguente formula:  $\frac{\text{ng di vettore} \times \text{kb dimensione di inserto} \times \text{ng di inserto}}{\text{kb dimensione del vettore}}$

## **2.8 Trasformazione batterica**

Ad un'aliquota di 80-100µl di batteri (ceppo di E. coli TOP-10) sono state aggiunte le opportune quantità di DNA (circa 10-50 ng di DNA per il ceppo di E. coli TOP-10). La soluzione ottenuta è stata incubata in ghiaccio per 30 minuti in modo che il DNA precipitasse sui batteri. I batteri sono stati poi sottoposti ad uno shock termico per 45 secondi a 42°C. Infine si sono mantenuti i batteri 3 minuti in ghiaccio e si sono lasciati crescere 45 minuti in agitazione in 500µl di LB liquido (bactotriptide 1%, estratto di lievito 0.5%, NaCl 1%) e si sono seminati su piastra, su LB-Agar (bactotriptide 1%, estratto di lievito 0.5%, NaCl 0.5%, agar 1.5%) in presenza dell'opportuno antibiotico. Le piastre sono state poi incubate per tutta la notte (16-18 ore) a 37°C.

## **2.9 Colture di batteri**

Si sono utilizzati batteri E. coli appartenenti al ceppo TOP-10. Per la loro crescita sono stati utilizzati LB liquido o LB-Agar a una temperatura di 37°C. Per selezionare i ceppi trasformati è stato aggiunto a tutti i terreni l'antibiotico cloramfenicolo alla concentrazione finale di 20µg/ml. Il terreno è stato anche autoclavato.

## **2.10 Screening delle colonie**

Lo screening delle colonie ricombinanti, ovvero la verifica della presenza e delle dimensioni dell'inserito, è stata effettuata mediante

PCR nei cloni cresciuti su piastra e in parallelo allestendo delle colture batteriche in LB-liquido con i cloni corrispondenti; sia le piastre che i terreni liquidi contenevano un opportuno antibiotico per la selezione. La PCR è stata eseguita direttamente sulla colonia batterica prelevata dalla piastra, usando gli oligonucleotidi opportuni, nelle medesime condizioni di reazione utilizzate per l'amplificazione della sequenza di interesse. Al termine della reazione, la presenza dei prodotti di amplificazione è stata verificata mediante elettroforesi in gel d'agarosio. I prodotti della PCR sono stati poi mandati a sequenziare al centro BMR Genomics (Padova).

## **2.11 Estrazione del DNA Plasmidico**

Le preparazioni di DNA plasmidico sono state effettuate utilizzando il QIAprep® Spin Miniprep kit (QIAGEN), che prevede l'utilizzo di colonnine in gel di silice per la purificazione del DNA, seguendo i protocolli indicati dalla ditta fornitrice. Tale kit permette di ottenere 5-15 µg di DNA a partire a 1.5ml di cultura batterica. Il DNA plasmidico è poi quantificato mediante spettrofotometro.

Per l'estrazione di DNA plasmidico da *B. subtilis*, i batteri vanno risospesi nel tampone di lisi contenente lisozima (1.5 mg/ml) e incubati per 10 min a 37 °C. Il resto della procedura è uguale a quella descritta sopra.

## 2.12 Quantificazione del DNA

La quantificazione del DNA è stata ottenuta misurandone l'assorbanza a  $\lambda=260$  nm usando lo spettrofotometro (beckman DU 530). Considerando che ad 1 unità di assorbanza a 260nm corrispondono 50  $\mu\text{g/ml}$  di DNA a doppia elica, la concentrazione di DNA viene calcolata come segue:

$$[\text{dsDNA}(\mu\text{g/ml})] = (\text{OD}_{260}) \times (\text{fattore di diluiz.}) \times (50 \mu\text{g DNA/ml}) / \text{OD}_{260}.$$

È stata valutata la purezza del DNA plasmidico estratto misurando il rapporto  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ . Un rapporto compreso tra 1.5 e 2.0 indica un livello ottimale di purificazione del DNA da proteine.

## 2.13 Digestione degli amplificati

L'approccio molecolare adottato in questo kit per lo studio delle mutazioni dei codoni 12 e 13 del gene K-ras è stato l'amplificazione della sequenza di interesse arricchita per la sequenza mutata, così come descritto al paragrafo 1.7.2.1 a.

Una volta accertata la presenza della mutazione attraverso l'analisi del peso molecolare delle bande prodotte dalla digestione si è proceduto con il sequenziamento al fine identificare con precisione il tipo di mutazione presente.

Protocollo di Digestione Enzimatica	
Buffer 10X	5 $\mu$ l
BSA 100X	0,5 $\mu$ l
Endonucleasi di Restrizione*	5 $\mu$ l
Olio Minerale	2 gocce
Amplificato	39,5 $\mu$ l
Volume finale	50 $\mu$ l

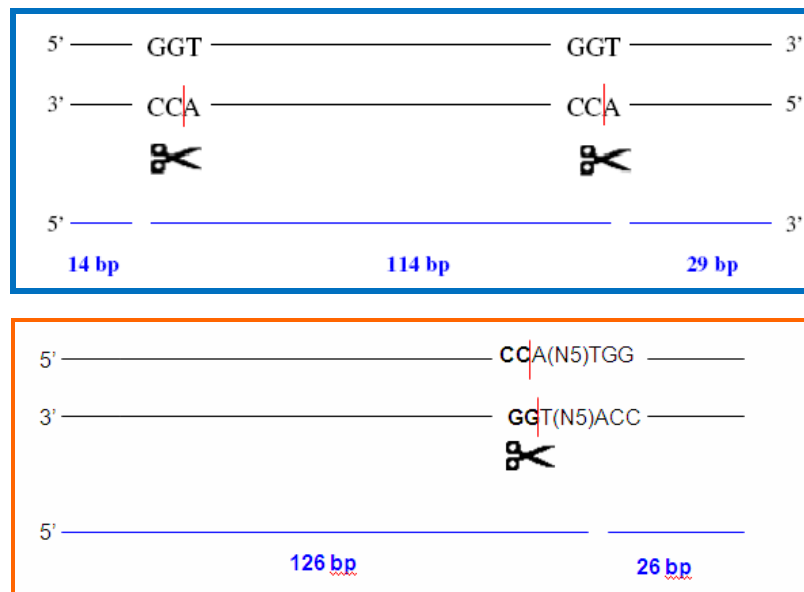
**Tabella 7:** protocollo di digestione enzimatica dei codoni 12 e 13 del gene K-RAS.

\*Per la digestione del codone 12 è stato adoperato l'enzima di restrizione BstNI.

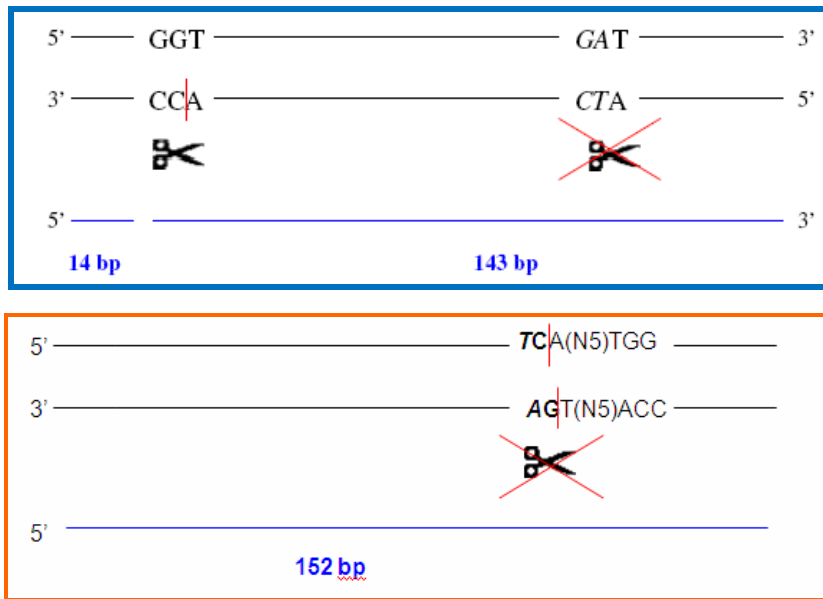
\*Per la digestione del codone 13 è stato utilizzato l'enzima di restrizione XbaI.

I prodotti della digestione sono stati risolti in un gel di agarosio ad alta risoluzione (3%) così come descritto al paragrafo 2.6.

Di seguito sono riportati i risultati attesi della digestione dei prodotti di amplificazione delle sequenze di interesse.



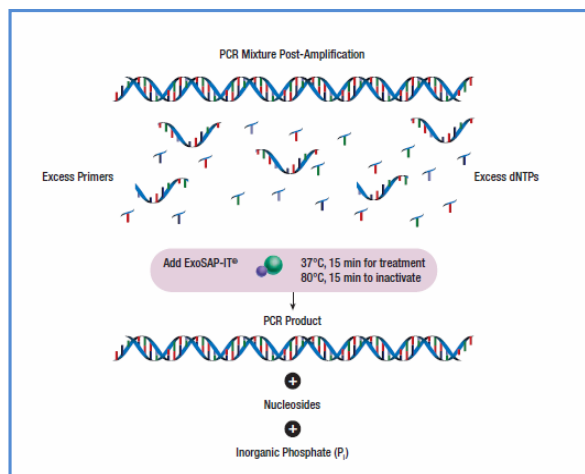
**Figura 16:** pattern di digestione dell'amplificato dell'allele normale. Il riquadro azzurro si riferisce al codone 12 del gene K-ras; il riquadro arancione si riferisce al codone 13 del gene K-ras.



*Figura 17: pattern di digestione dell'amplificato dell'allele mutato. Il riquadro azzurro si riferisce al codone 12 del gene K-ras; il riquadro arancione si riferisce al codone 13 del gene K-ras.*

## 2.14 Sequenziamento del DNA

Prima di procedere al sequenziamento, ciascuno dei frammenti di DNA amplificati è stato purificato da residui di primers non appaiati e da dNTPs in eccesso non incorporati nella reazione di PCR. Entrambi, infatti, sono in grado di interferire con il processo del sequenziamento;



*Figura 18: il metodo ExoSap-IT®*

i primi formando dimeri o appaiandosi con il DNA stampo, mentre i secondi alterando il giusto rapporto dNTPs/ddNTPs necessario per il sequenziamento. Come sistema di purificazione è stato scelto un metodo enzimatico che sfrutta l'attività idrolitica di due enzimi; uno è l'esonucleasi I (EXO1), l'altro è la fosfatasi alcalina SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase). EXO1 è un enzima ricombinante, ottenuto da *E.coli* NM554 ed espresso in un ceppo *E.coli* competente, che ha attività esonucleasica 3'→5' attiva su DNA single strand; EXO1 permette, quindi, di degradare i primers in eccesso senza però danneggiare gli amplificati. SAP è una fosfatasi estratta da *Pandalus borealis* (gamberetto artico) che idrolizza i dNTPs a livello del gruppo fosfato liberando deossinucleosidi e fosfato inorganico. I due enzimi, commercialmente, si trovano sotto forma di un unico prodotto che si chiama ExoSAP-IT® (usb-Affymetrix) e vanno aggiunti in proporzione di 1:5 rispetto alla quantità di campione; nel caso specifico è stato aggiunto 1µl di reagente ExoSAP a 2.5 µl di prodotto di PCR.

I campioni così preparati sono stati in seguito posti in un termociclatore impostato con il seguente programma:

- 37°C 15 minuti ⇒ Attivazione enzima
- 80°C 15 minuti ⇒ Inattivazione dei due enzimi
- 4°C 10 minuti ⇒ Stabilizzazione dei campioni

Al termine della reazione di purificazione ad ogni campione è stato aggiunto 1µl di primer (10 pmol/µl) o forward o reverse, specifico per

ogni esone (i primers usati sono gli stessi riportati nelle tabelle soprastanti) e i campioni sono stati posti in stufa a 68°C fino alla completa evaporazione dell'acqua. Il sequenziamento è stato effettuato dal servizio di sequenziamento del BMR Genomics, attraverso l'impiego della tecnologia dei Big Dye terminator v3.1 e i sequenziatori automatici ABI 3730XL a 96 capillari e ABI 3100 a 16 capillari (Applied Biosystem). I risultati sono forniti sotto forma di cromatogrammi in formato \*.abi e sono stati analizzati con il programma SeqManII, allineando le sequenze con le rispettive sequenze di riferimento ottenute dall'NCBI, al fine di individuarne le alterazioni di sequenza.

## **3 Risultati**

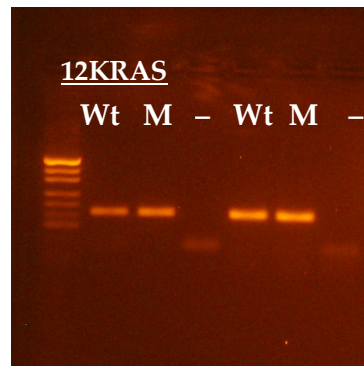
### **3.1 Gene K-RAS**

Il meeting del 2008 dell'ASCO (*American Society of Clinical Oncology*) ha presentato evidenze per cui pazienti con tumori al colon in stadio avanzato non avrebbero alcun beneficio dalla somministrazione di cetuximab (Erbix) e panitumumab (Vectibix), se mutati per il gene k-ras. Lo stato mutazionale di k-ras è quindi un marcatore predittivo per la risposta alla terapia anti tumorale ed è stato oggetto di questo lavoro di tesi progettare un kit diagnostico marcato CE IVD capace di determinare la presenza di mutazioni ai codoni 12 e 13 del medesimo gene.

### **3.2 Clonaggio**

Dopo aver costruito i primers per l'amplificazione specifica delle sequenze di interesse, si sono testati su gel di agarosio i prodotti di amplificazione di una sequenza wild-type e di una mutata per verificare se le condizioni di reazione scelte fossero adatte (Figura 19). I prodotti di amplificazione sono stati quindi clonati usando un kit commerciale, il pGEM®-T EASY VECTOR (Promega). I pGEM®-T EASY VECTORS sono dei vettori linearizzati con una singola timidina 3' terminale a entrambe le estremità. Tale base non appaiata si viene a trovare a livello del sito di inserzione e quindi contribuisce in modo sostanziale ad aumentare l'efficienza di ligazione dei

prodotti di PCR, prevenendo la ricircularizzazione del vettore e fornendo un'estremità sticky agli amplificati. L'approccio utilizzato è, inoltre, molto vantaggioso perché permette di effettuare una reazione di ligazione a temperatura ambiente, in tempi brevi (circa 1 ora) e con un *rate* di ricombinanti molto elevato (>90%). Il vettore usato è di tipo high-copy-number e contiene i promotori per la T7 e la SP6 RNA Polimerasi che fiancheggiano la regione di clonazione; è inoltre presente la sequenza per l' $\alpha$ -peptide dell'enzima  $\beta$ -galattosidasi, la cui inattivazione a seguito dell'avvenuta inserzione, consentirà lo screening delle colonie che hanno incorporato il plasmide.



**Figura 19:** analisi in gel di agarosio degli amplificati relativi ai codoni 12 e 13 del gene K-RAS. Ordine di caricamento da sinistra verso destra. Nella lane 1 è stato caricato il marker di peso molecolare; nella lane 2 compare la banda relativa al codone 12 del gene k-ras wild type; nella lane tre appare la banda del medesimo codone ma di un campione mutato; nelle lane quattro e sette sono stati caricati i controlli negativi; nelle lane 5 e 6 sono stati caricati i prodotti di PCR del codone 13 rispettivamente wild

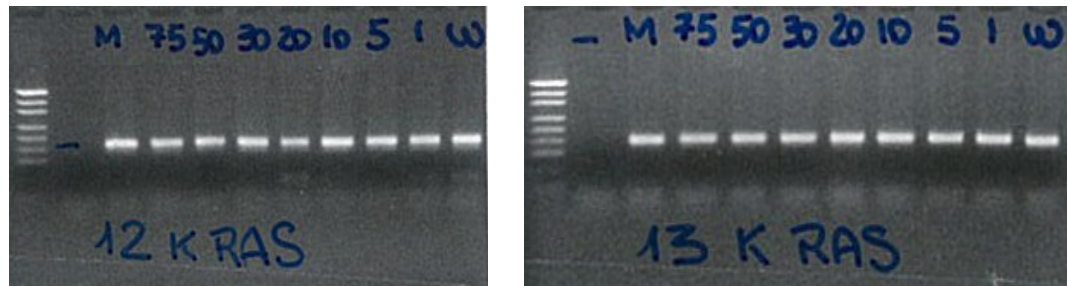
Con le miscele di ligazione sono stati trasformati mediante shock termico dei batteri competenti del ceppo TOP10 di *E. coli* scelti per amplificare il numero di copie di plasmide.

Alcune delle colonie cresciute sono state sottoposte ad uno screening mediante PCR, utilizzando i primers usati per l'amplificazione delle sequenze target, al fine di verificare la presenza dell'inserito nei cloni cresciuti. I prodotti di amplificazione sono stati poi caricati in gel di agarosio per controllare la dimensione degli amplificati e confrontarla con quella attesa.

Delle colonie risultate positive allo screening, è stato isolato, secondo il protocollo riportato nella sezione materiali e metodi, il DNA plasmidico che è stato quindi quantificato allo spettrofotometro.

### **3.3 Prove di sensibilità della reazione di PCR**

L'avvenuta amplificazione ha portato ad effettuare delle prove di sensibilità della reazione di PCR sia per il codone 12 che per il codone 13 del gene K-RAS. Si sono quindi allestite delle reazioni di PCR utilizzando come templatò i plasmidi, descritti nella sezione materiali e metodi, diluiti  $10^6$  C/ $\mu$ l. Per ogni campione sono stati utilizzati 3 $\mu$ l di una soluzione ottenuta miscelando percentuali differenti di plasmidi contenenti la sequenza wild-type e quella mutata.



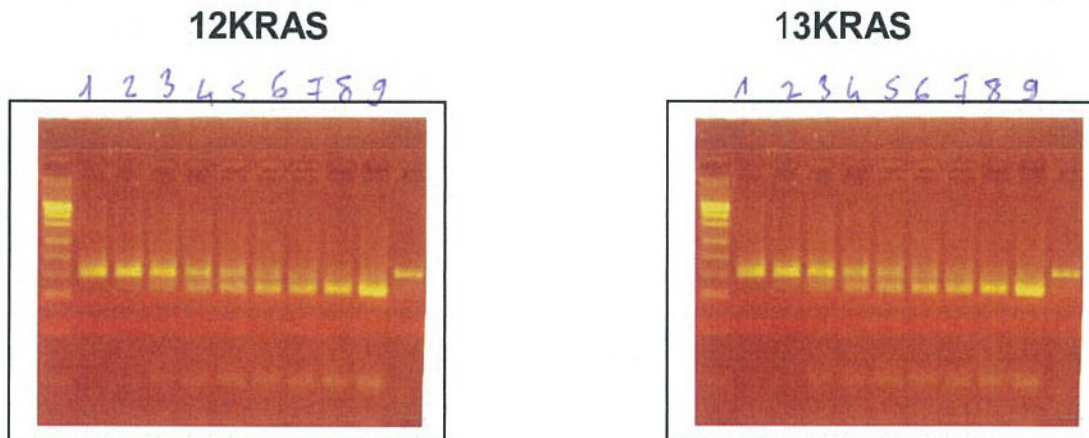
**Figura 20:** visualizzazione su gel di agarosio dei prodotti di amplificazione delle sequenze relative ai codoni 12 e 13 del gene K-RAS. Ordine di caricamento da sinistra verso destra. Nella prima lane si è caricato un marcatore di peso molecolare; nella seconda lane è stato caricato il controllo negativo di reazione (ottenuto sostituendo l'acqua al DNA); nella lane successive sono stati caricati i prodotti di amplificazione di campioni rispettivamente 100% mutati, 75% mutati, 50% mutati, 30% mutati, 20% mutati, 10% mutati, 5% mutati, 1% mutati e infine 0% mutati.

I prodotti di amplificazione, dopo essere stati testati come descritto nel paragrafo 3.3, sono stati sottoposti ad analisi molecolare mediante la tecnica dell'RFLP. I risultati della digestione sono riportati nella figura 21.

**LEGENDA:**

1	100% mutato
2	75% mutato
3	50% mutato
4	30% mutato
5	20% mutato
6	10% mutato
7	5% mutato
8	1% mutato
9	100% wild type

*Figura 21: visualizzazione su gel di agarosio del risultato della digestione enzimatica degli amplificati dei codoni 12 e 13 del gene K-RAS. Nella lane 1 è stato caricato il marcatore di peso molecolare. Nelle lanes successive sono stati caricate restrizioni di campioni contenenti percentuali differenti di sequenze wild-*



Dopo un'accurata analisi dei metodi di screening attualmente disponibili sul mercato e delle diverse caratteristiche di ciascuno, la scelta è ricaduta sull'RFLP in quanto è una tecnica molto sensibile e specifica, semplice da eseguire e rapida, risultando quindi facilmente implementabile nei laboratori che si occupano di diagnostica clinica. Il saggio, inoltre, non richiede attrezzature particolari cosa che lo rende davvero una soluzione interessante per effettuare screening in modo rapido, economico e affidabile.

### 3.5 Validazione esterna

Una volta messo a punto sia il protocollo di amplificazione che quello di restrizione, si è deciso di fornire il kit così costituito: mix di PCR e mix di digestione enzimatica, a due laboratori indipendenti in modo da validare il kit.

Gli Ospedali che si sono resi disponibili a questo servizio sono stati quelli di Udine e Catania. Di seguito sono riportati, sotto forma di tabella, i risultati dell'analisi di 65 campioni. Alcuni dei campioni che sono risultati mutati con la tecnica dell'RFLP, sono stati genotipizzati con il sequenziamento diretto. In tutti i casi il risultato dell'RFLP e del sequenziamento diretto è stato concordante, tranne che nel campione n°23 di Catania, wild-type secondo il sequenziamento e mutato secondo l'RFLP. Tale discrepanza deriva molto probabilmente dalla differente sensibilità delle due metodiche, maggiore per l'RFLP e minore per il sequenziamento.

	12		13	
	FFLP	Seq.	FFLP	Seq.
1	ht		wt	
2	ht	GGT/GTT	wt	GCC
3	wt	GGT	wt	GCC
4	wt	GGT	wt	GCC
5	ht	GGT	wt	GCC
6	ht		wt	
7	ht		ht	
8	wt	GGT	ht	GCC/GCC
9	mut		mut	
10	wt		wt	
11	ht		wt	
12	wt		wt	
13	wt		wt	
14	wt		wt	
15	wt		wt	
16	wt		wt	

	12		13	
	FFLP	Seq.	FFLP	Seq.
17	wt	GGT	ht	GCC
18	wt		wt	
19	wt		wt	
20	wt		wt	
21	wt		wt	
22	mut			
23	wt			
24	wt		wt	
25	wt		wt	
26	wt		wt	
27	wt		wt	
28	wt		wt	
29	wt		wt	
30	wt		wt	
31	mut.		wt	

*Figura 22: confronto dei dati ottenuti analizzando i campioni con l'RFLP e con il sequenziamento, presso l'Azienda Ospedaliera Santa Maria della Misericordia di Udine.*

	12		13	
	FFLP	Seq.	FFLP	Seq.
1	ht		wt	
2	wt		wt	
3	wt		wt	
4	wt		wt	
5	wt		wt	
6	ht		wt	
7	wt		wt	
8	ht		wt	
9	wt		wt	
10	wt		wt	
11	wt	GGT	wt	GCC
12	wt	GGT	wt	GCC
13	wt	GGT	ht	GCC/GCC
14	wt	GGT	wt	GCC
15	wt		mut	
16	wt		wt	
17	mut	GCT	wt	

	12		13	
	FFLP	Seq.	FFLP	Seq.
18	wt	GGT	wt	GCC
19	wt	GGT	wt	GCC
20	wt	GGT	wt	GCC
21	mut	GCT	wt	GCC
22	wt	GGT	wt	GCC
23	mut	GGT	wt	GCC
24	mut	GCT	wt	GCC
25	mut	GCT	mut	GCC
26	wt	GGT		GCC
27	wt	GGT	wt	GCC
28	mut	GCT	wt	GCC
29	mut	GCT		GCC
30	wt	GGT		GCC
31	mut	GTT		GCC
32	wt	GGT		GCC
33	wt	GGT		GCC
34	wt	GGT		GCC

*Figura 23: confronto dei dati ottenuti analizzando i campioni con l'RFLP e con il sequenziamento, presso l'Azienda Ospedaliera Cannizzaro di Catania.*

### 3.6 Gene HLA

E' stato dimostrato che l'allele HLA-B\*57:01 in pazienti HIV+ ha un significato altamente predittivo per l'individuazione dei soggetti ipersensibili al farmaco di elezione Abacavir.

Proprio in virtù di questo ormai ben accertato valore predittivo, nell'iter terapeutico di tutti i pazienti diagnosticati come HIV+ è preliminarmente raccomandata la ricerca dell'allele HLA B\*57:01 e oggi, grazie all'introduzione del test farmacogenetico, sono stati drasticamente ridotti i casi di ipersensibilità e reazioni avverse al farmaco, come è ben documentato anche dai risultati dello studio prospettico randomizzato, PREDICT 1.

La reazione di ipersensibilità ad Abacavir è caratterizzata da febbre, rash e una combinazione di altri sintomi come mal di testa e sintomi gastrointestinali, che tipicamente insorgono nelle prime 6 settimane dall'inizio della terapia.

L'organizzazione genomica e l'assetto aplotipico della regione di suscettibilità sono ormai ben note ed il locus di suscettibilità risiede specificamente nell'aplotipo ancestrale 57.1, identificato oltre che da B\*57:01 anche da DRB1\*0701 e DQB1\*0303.

In questo lavoro di tesi ci si è quindi proposti di sviluppare un metodo semplice di tipizzazione del locus HLA-B\*57 per l'individuazione dei soggetti HIV positivi, a rischio farmacogenetico per l'uso di Abacavir, in modo anche da venire incontro alle esigenze

dei Laboratori di Diagnostica Clinica che sfruttano kits Home-Made, spesso non così discriminanti e specifici.

Le strategie per raggiungere l'obiettivo sono diverse e comprendono:

- a) La tipizzazione sierologica HLA, seguita da genotipizzazione ad alta risoluzione (PCR-SSP o sequenziamento) dei campioni B\*57 positivi;
- b) La genotipizzazione in bassa risoluzione (PCR-SSP o PCR-SSO) del locus HLA-B seguita dalla genotipizzazione ad alta risoluzione (PCR-SSP o sequenziamento) dei campioni B\*57 positivi;
- c) L'amplificazione multiplex allele-specifica (PCR-SSP) di B\*57:01;
- d) Il sequenziamento diretto del locus HLA-B.

Queste due ultime strategie presentano l'ovvio vantaggio di arrivare al risultato con un unico metodo, tuttavia il sequenziamento diretto non è eseguito di routine nei laboratori HLA in cui il test viene normalmente richiesto.

Il metodo sviluppato in questo lavoro di tesi si basa sulla combinazione di tre reazioni di PCR (PCR-SSP), capaci di identificare i principali alleli del locus HLA-B\*57, con la tipizzazione di un polimorfismo di sequenza, lo SNP rs2395029 che specificatamente si associa all'allele di suscettibilità HLA-B\*57:01.

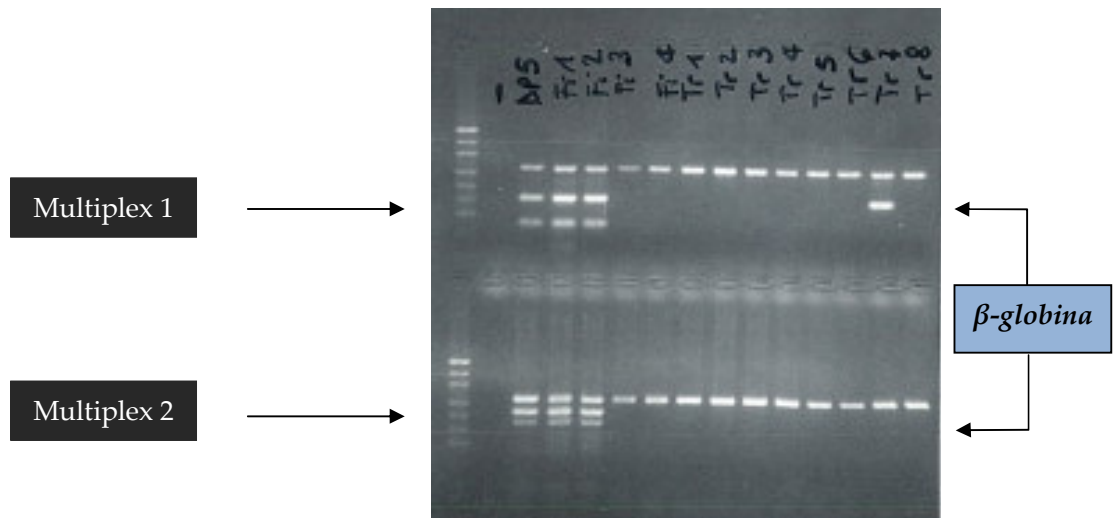
### **3.7 Risultati delle reazioni di PCR-SSP**

Inizialmente, per discriminare l'allele HLA-B\*57:01, si era focalizzata l'attenzione sullo SNP rs2227956 del gene della proteina HSP 70, che sembrava essere in *linkage disequilibrium* con l'allele di suscettibilità.

L'amplificazione mediante ARMS-PCR dello SNP però, non ha portato a dei risultati soddisfacenti in termini di specificità. Lo SNP, infatti, era presente sia in soggetti HLA-B\*57:01 positivi che negativi, portandoci a concludere che fosse più propriamente in *linkage disequilibrium* con il generico locus HLA-B\*57 piuttosto che con quello B\*57:01. Basandosi su dati di letteratura si è quindi concentrata l'attenzione su uno SNP diverso, l' rs 2395029 del gene per la proteina HSP-5, che sembra essere in forte linkage disequilibrium con l'allele di interesse.

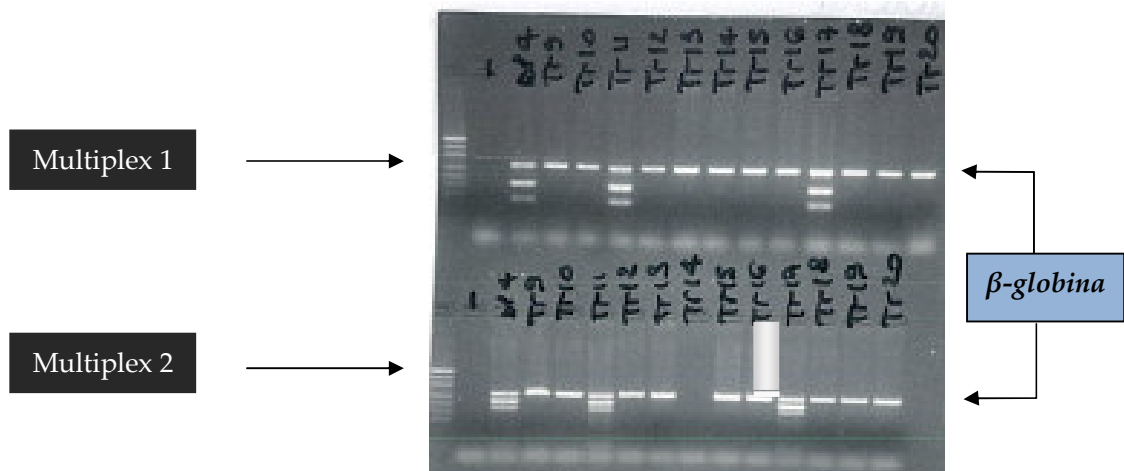
Si è poi proceduto con la creazione delle multiplex, così come descritto nella sezione materiali e metodi, e con la loro validazione su 49 campioni di DNA.

Di seguito sono riportati i risultati suddivisi per ogni multiplex.

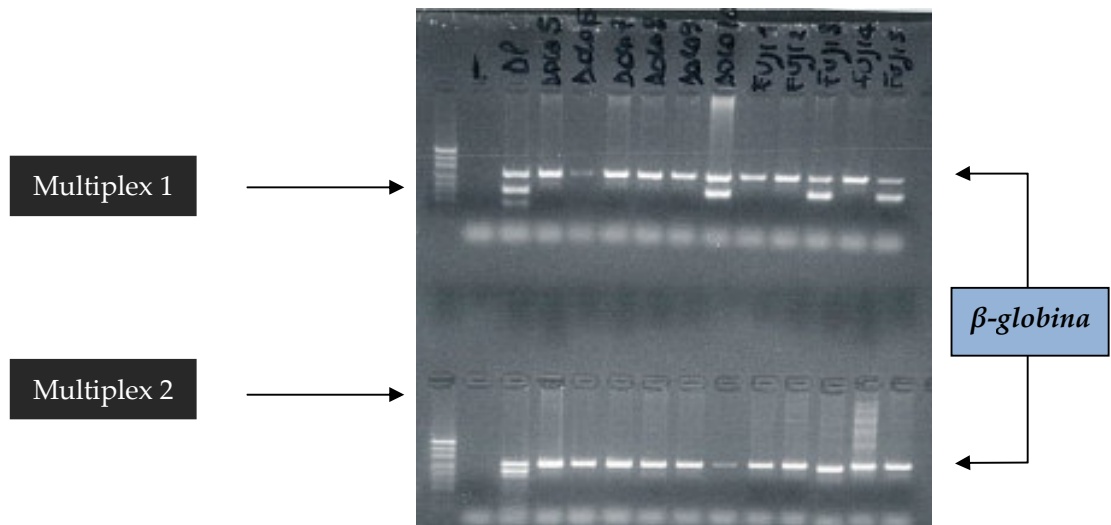


**Figura 24:** caricamento da sinistra verso destra.

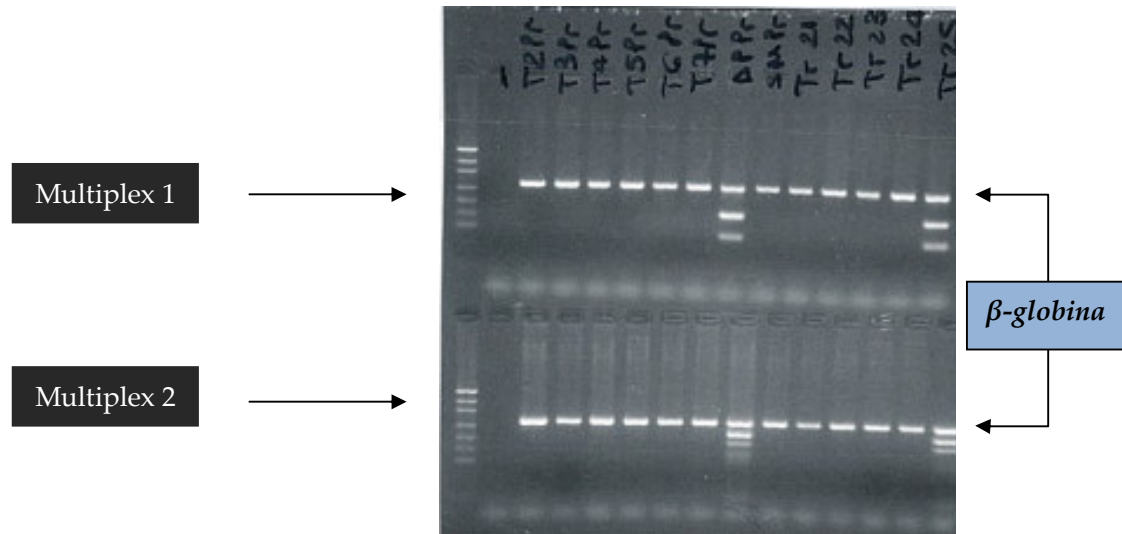
Lane 1: marcatore di peso molecolare; lane 2: controllo negativo di reazione; lanes 3-15: campioni esaminati. La banda più pesante corrisponde all'amplificato del gene  $\beta$ -globina. I campioni DP5, Fi1 e Fi2 risultano positivi per il locus HLA-B\*57:01; i campioni Fi3, Tr1, Tr2, Tr4, Tr5, Tr6 e Tr8 sono HLA-B\*57:01 negativi; il campione Tr7 risulta positivo solo per lo SNP HCP 5.



**Figura 25:** caricamento da sinistra verso destra. Lane 1: marcatore di peso molecolare; lane 2: controllo negativo di reazione; lanes 3-13: campioni esaminati. La banda più pesante corrisponde all'amplificato del gene  $\beta$ -globina. I campioni DP4, Tr11 e Tr17 risultano positivi per il locus HLA-B\*57:01; i campioni Tr9, Tr10, Tr12, Tr13, Tr14 e Tr15, Tr16, Tr18, Tr19 e Tr20 sono HLA-B\*57:01 negativi.



**Figura 26:** caricamento da sinistra verso destra. Lane 1: marcatore di peso molecolare; lane 2: controllo negativo di reazione; lanes 3-14: campioni esaminati. La banda più pesante corrisponde all'amplificato del gene  $\beta$ -globina. Il campione DP risulta positivo per il locus HLA-B\*57:01; i campioni DOLO 10, Fuji 3 e Fuji 5 presentano lo SNP HCP 5; i campioni DOLO 5, 6, 7, 8, 9 e Fuji 1, 2, 4 sono HLA-B\*57:01 negativi.



**Figura 27:** caricamento da sinistra verso destra.

Lane 1: marcatore di peso molecolare; lane 2: controllo negativo di reazione; lanes 3-15: campioni esaminati. La banda più pesante corrisponde all'amplificato del gene  $\beta$ -globina. I campioni DPPe e Tr25 sono gli unici ad essere positivi per il locus HLA-B\*57:01; i restanti sono HLA-B\*57:01 negativi.

Come si può apprezzare dai dati ottenuti, le due multiplex hanno fornito risultati concordanti. Si è quindi proceduto con una validazione esterna delle multiplex, avvalendosi della collaborazione con il Dipartimento di Fisiopatologia Clinica, sezione Genetica Medica dell'Università di Firenze. Il kit è stato testato su 151 campioni e in base quanto ottenuto ne sono state valutate le performance. Il coefficiente di correlazione è stato valutato tramite il modello lineare generalizzato (GLM) prendendo in considerazione una famiglia di distribuzione binomiale e un livello di significatività  $\alpha$  pari al 5%. Per l'analisi dei dati è stato utilizzato il programma

statistico R-GUI la cui esattezza è stata verificata mediante un test  $\chi^2$  di Pearson, con un grado di libertà.

## 4 Discussioni e Conclusioni

Le ricerche svolte in questo lavoro di tesi hanno riguardato la progettazione di due kits commerciali, uno per l'analisi dello stato mutazionale del gene K-RAS (GENEQUALITY 12-13-K-RAS) e uno per la tipizzazione del locus HLA-B\*57 in soggetti HIV positivi (GENEQUALITY HLA-B\*57:01). Per ognuno dei due kit sono state valutate le performance.

### 4.1 Kit GENEQUALITY 12-13-K-RAS

- Il Kit GENEQUALITY 12-13-K-RAS è stato sottoposto a validazione interna presso i laboratori dell'Azienda AB ANALITICA e a validazione esterna presso l'Istituto di Anatomia Patologica di Udine (Policlinico Universitario P.le della Misericordia; referenti Prof.ssa Mariuzzi e Dr.ssa Marzinotto) e presso l'Azienda Ospedaliera Cannizzaro di Catania (referenti: Dr. Grasso e Dr.ssa Cafici).
- Il Kit ha dimostrato di possedere sia una sensibilità che una specificità diagnostiche del 100% avendo correttamente individuato la mutazione in 13 campioni (10 campioni mutati al codone 12; 1 campione mutato al codone 13; 2 campioni mutati in entrambi i codoni) di cui era noto a priori la positività. La specificità del Kit è del 100%.

- Per quanto riguarda la sensibilità analitica, il kit è in grado di individuare la mutazione quando almeno 5 alleli su 100 sono mutati, sia per il codone 12 che per il codone 13 del gene K-RAS. L'allineamento dei primers nelle più comuni banche dati ha rivelato l'assenza di appaiamenti aspecifici e/o di fenomeni di cross-reazione con DNA Genomico, pertanto è garantita la specificità analitica del Kit.

Una prospettiva futura è quella di sviluppare un prototipo di IVD per la determinazione, mediante ARMS Real Time PCR, dello stato mutazionale dei codoni 12 e 13 dell'esone 2 del gene k-ras, in particolare delle mutazioni più frequenti e quindi più rilevanti dal punto di vista diagnostico (tabella 8).

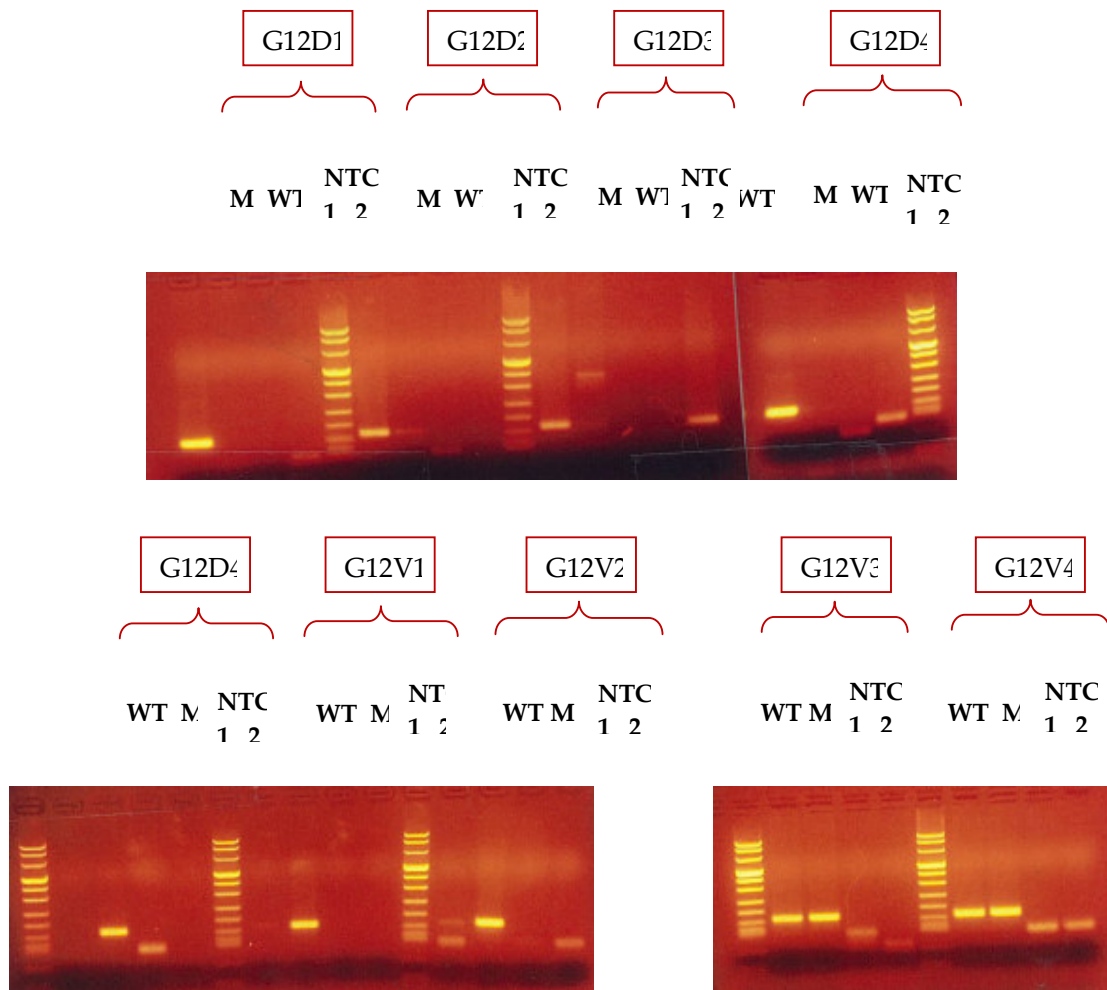
<b>G12D</b>	Gly12Asp	GGT>GAT
<b>G12V</b>	Gly12Val	GGT>GTT
<b>G12A</b>	Gly12Ala	GGT>GCT
<b>G12C</b>	Gly12Cys	GGT>TGT
<b>G12S</b>	Gly12Ser	GGT>AGT
<b>G12R</b>	Gly12Arg	GGT>CGT
<b>G13D</b>	Gly13Asp	GGC>GAT

*Tabella 8: riassunto delle mutazioni più frequenti che interessano i codoni 12 e 13 del gene K-RAS.*

Alcune fasi del progetto sono già state svolte, in particolare per ciascuna delle sette mutazioni indicate sono stati disegnati sei primers forward ARMS, caratterizzati ciascuno dalla specifica base mutata in 3' più un mismatch aggiuntivo in second'ultima o terz'ultima posizione. Di tutti i primer disegnati, sono stati acquistati 4 primers per ciascuna delle mutazioni (le più frequenti) G12D, G12V e G13D più il primer reverse (comune per tutte le mutazioni).

Dei primers acquistati, sono stati testati i primers G12D e G12V per scegliere il primer forward migliore in termini di efficienza e specificità dell'amplificazione. Sulla base dei risultati ottenuti (Fig. 28) sono state scelte le coppie di primers G12D1 e G12V1 perché:

- più efficienti (maggiore intensità delle bande specifiche)
- più specifici (assente o debole amplificazione aspecifica)
- con NTC (*No Template Control*) più "puliti".



**Figura 28:** risultato del caricamento su gel di agarosio delle reazioni di Real Time PCR eseguite con le coppie di primers G12D1, 2, 3 e 4 e G12V1, 2, 3 e 4, con plasmide specifico G12D o G12V (M) e wild-type (WT).

Inoltre, per le mutazioni G12V e G12D sono stati eseguiti i primi esperimenti di sensibilità, utilizzando miscele di DNA plasmidico (in diverse percentuali) in *background* di differenti quantità di DNA genomico (da 70ng a circa 5ng di DNA). Tali miscele sono state amplificate in parallelo sia per la mutazione che per il gene di

controllo (TBXSA), in tre sedute differenti. Dai dati ottenuti è stato possibile trarre le seguenti conclusioni sia per G12V che per G12D:

1) Considerando il  $\Delta Ct$  (Ct mut-Ct gene controllo), la sensibilità del sistema è dell'1,25% per tutti i *background* di DNA (cioè il  $\Delta Ct$  dello 0% è sempre maggiore di quello della diluizione 1,25% in tutte e 3 le prove e considerando tutti i *background* di DNA); è invece pari a 0,5% se si esclude dall'analisi il background 5 ng;

2) Considerando le curve di dissociazione, si "recupera" la sensibilità dello 0,5% anche per il *background* 5 ng, in quanto è evidente che il picco del profilo di dissociazione dello 0% non è quello specifico della mutazione .

In Appendice sono riportate le curve di dissociazione degli esperimenti di sensibilità delle mutazioni G12D e G12V, utilizzando 70 ng, 35 ng e 5 ng di DNA. Le curve rosse si riferiscono a campioni contenenti il 50% di DNA mutato, le curve verdi a campioni contenenti il 5% di DNA mutato, le curve viola a campioni con il 2,5% di DNA mutato e infine le curve blu e azzurre a campioni contenenti l'1,25% e lo 0,5% di DNA mutato.

## 4.2 Kit GENEQUALITY HLA-B\*57:01

- Per la determinazione della sensibilità/specificità diagnostica del Kit, sono stati analizzati 151 campioni, di genotipo precedentemente determinato con altri CE-IVD (INNOLIPA HLA-B Update Plus; Olerup SSP HLA-B\*57), presso il Dip. Di Fisiopatologia Clinica, sez. Genetica Medica, dell'Università di Firenze.

Dall'analisi sono stati esclusi 4 campioni perché il DNA non è risultato idoneo all'amplificazione in PCR e 36 campioni HLA-B\*57, in quanto non provvisti di tipizzazione a 4 digits. Su 151 campioni inclusi nello studio, tutti i 73 campioni HLA-B\*57:01 positivi e i 78 negativi sono stati confermati tali anche dal dispositivo in esame. È stato quindi calcolato un valore di sensibilità/specificità diagnostica pari al 100%.

- La specificità analitica del Kit GENEQUALITY HLA-B\*57:01 è stata garantita dalla scelta accurata e specifica di primers derivanti dal lavoro scientifico di Martin (Martin et al., 2005) ed ulteriormente verificati da uno studio bioinformatico effettuato, nonché dall'utilizzo di condizioni di amplificazioni stringenti. La specificità analitica dei primers usati è stata inoltre comprovata dai risultati sperimentali ottenuti.
- Sono state effettuate numerose prove di amplificazione per valutare quale fosse il range ottimale di DNA da amplificare (data non

shown); i dati raccolti sulle concentrazioni di DNA, durante studi preliminari di validazione interna del Kit, hanno indicato il funzionamento del Kit con valori di concentrazione di DNA variabile, con un valore medio pari a 45 ng/μl. È stato pertanto desunto un range ottimale di DNA compreso tra 90 e 120 ng di DNA.

- Per quanto riguarda i parametri di correlazione tra lo SNP HCP-5 e l'allele HLA-B\*57:01, i valori ottenuti sono riportati in tabella 8; i dati acquisiti sono stati ritenuti soddisfacenti, così come è stata ritenuta importante l'amplificazione aggiuntiva dello SNP HCP-5 per aumentare il potere discriminativo del test.

		HLA B*57:01		
		+	—	TOT
SNP HCP-5	+	73	3	76
	—	0	75	75
	TOT	73	78	151

**Tabella 9:** tabella a doppia entrata relativa allo SNP HCP-5 e all'allele HLA B\*57:01. Dal calcolo dei parametri di correlazione emerge che la sensibilità del kit è pari al 100% (73/73); la specificità è del 96,2% (75/78); il valore predittivo positivo è al 96% (73/78), mentre quello negativo è al 100% (75/75). L'accuratezza è pari al 98% (148/151).

## Bibliografia

**Bos J.L.**

Ras oncogene in human cancer: a review

*Cancer Res*, 49(17):4682-9, 1989

**Carteni G., Fiorentino R., Vecchione L., Chiurazzi B., Battista C.**

Panitumumab a novel drug in cancer treatment

*Ann Oncol*, 18 Suppl 6:vi16-21, 2007

**Colombo S., Rauch A., Rotger M., Fellay J., Martinez R., Fux C., Thurnheer C., Günthard H.F., Goldstein D.B., Furrer H., Telenti A.**

The HCP5 single-nucleotide polymorphism: a simple screening tool for prediction of hypersensitivity reaction to abacavir

*J Infect Dis*. 2008 Sep 15;198(6):864-7

**De Maglio G., Aprile G., Mazzer M., Cernic S., Foltran L., Lutrino S., De Pauli F.,**

**Cardellino G., Romano E., Fasola G., Pizzolitto S.**

The Pyrosequencing Experience: Testing Colorectal Cancer Patients For Kras Status In The Clinical Practice

*Ann Oncol*, 21(suppl 6): vi31-vi121, 2010

**Di Fiore F., Blanchard F., Charbonnier F., Le Pessot F., Lamy A., Galais M.P., Bastit L., Killian A., Sesboüé R., Tuech J.J., Queuniet A.M., Paillot B., Sabourin J.C., Michot F., Michel P., Frebourg T.**

Clinical relevance of KRAS mutation detection in metastatic colorectal cancer treated by Cetuximab plus chemotherapy

*Br J Cancer*, 96(8):1166-9, 2007

**Di Nicolantonio F., Martini M., Molinari F., Sartori-Bianchi A., Arena S., Saletti P., De Dosso S., Mazzucchelli L., Frattini M., Siena S., Bardelli A.**

La risposta la panitumumab o al cetuximab nel carcinoma coloretale metastatico richiede la forma wild-type di BRAF

*J Clin Oncol*, 26:5705-5712, 2008

**Fearon E.R., Vogelstein B.**

A genetic model for colorectal tumorigenesis

*Cell*,61(5):759-6, 1990 Jun 1

**Frattini M., Balestra D., Suardi S., Oggioni M., Alberici P., Radice P., Costa A., Daidone M.G., Leo E., Pilotti S., Bertario L., Pierotti M.A.**

Different genetic features associated with colon and rectal carcinogenesis

*Clin Cancer Res*, 10(12 Pt 1):4015-21, 2004

**Kamali F, Wynne H**

Pharmacogenetics of warfarin

*Annu Rev Med*, 61:63-75, 2010

**Karsa L., Lignini T.A., Patnick J., Lambert R., Sauvaget C.**

The dimensions of the CRC problem

*Best Pract Res Clin Anaesthesiol*, 24(4):381-96, 2010 Aug;

**Kelloff G.J., Bast R.C. Jr, Coffey D.S., D'Amico A.V., Kerbel R.S., Park J.W., Ruddon R.W., Rustin G.J., Schilsky R.L., Sigman C.C., Wounde G.F.**

Biomarkers, surrogate end points, and the acceleration of drug development for cancer prevention and treatment: an update prologue

*Clin Cancer Res*, 10(11):3881-4, 2004

**Kim G.P., Grothey A.**

Targeting colorectal cancer with human anti-EGFR monoclonal antibodies: focus on panitumumab

*Biologics*, 2(2):223-8, 2008

**Lee K.C., Ma J.D., Kuo G.M.**

Pharmacogenomics: bridging the gap between science and practice

*J Am Pharm Assoc*, 50(1):e1-14, 2010

**Loupakis F., Ruzzo A., Cremolini C., Vincenzi B., Salvatore L., Santini D., Masi G., Stasi I., Canestrari E., Rulli E., Floriani I., Bencardino K., Galluccio N., Catalano V., Tonini G., Magnani M., Fontanini G., Basolo F., Falcone A., Graziano F.**

KRAS codon 61, 146 and BRAF mutations predict resistance to cetuximab plus irinotecan in KRAS codon 12 and 13 wild-type metastatic colorectal cancer

*Br J Cancer*, 101(4):715-21., 2009

**Mallal S., Phillips E., Carosi G., Molina J.M., Workman C., Tomazic J., Jägel-Guedes E., Rugina S., Kozyrev O., Cid J.F., Hay P., Nolan D., Hughes S., Hughes A., Ryan S., Fitch N., Thorborn D., Benbow A.**

HLA-B\*5701 screening for hypersensitivity to abacavir

*N Engl J Med*, 358(6):568-79, 2008

**Marshall J.L., Eisenberg S.G., Johnson M.D., Hanfelt J., Dorr F.A., El-Ashry D., Oberst M., Fuxman Y., Holmlund J., Malik S.**

A phase II trial of ISIS 3521 in patients with metastatic colorectal cancer

*Clin Colorectal Cancer*, 4(4):268-74, 2004

**Martin A.M., Nolan D., Mallal S.**

HLA-B\*5701 typing by sequence-specific amplification: validation and comparison with sequence-based typing

*Tissue Antigens*, 65(6):571-4, 2005

**Mega J.L., Close S.L., Wiviott S.D., Shen L., Hockett R.D., Brandt J.T., Walker J.R., Antman E.M., Macias W., Braunwald E., Sabatine M.S.**

Cytochrome p-450 polymorphisms and response to clopidogrel

*N Engl J Med*, 360(4):354-62, 2009

**Murray M., Petrovic N.**

Cytochromes P450: decision-making tools for personalized therapeutics

*Curr Opin Mol Ther*, 8(6):480-6, 2006

**Orlando L., Schiavone P., Fedele P., Calvani N., Nacci A., Rizzo P., Marino A., D'Amico M., Sponziello F., Mazzoni E., Cinefra M., Fazio N., Maiello E., Silvestris N., Colucci G., Cinieri S.**

Molecularly targeted endocrine therapies for breast cancer

*Cancer Treat Rev*, 36S3:S67-S7, 2010

**Recchia G., Pirazzoli A**

La farmacogenetica può cambiare l'approccio alla terapia HAART?

*Quaderni di Malattie Infettive e Tropicali*, 1,32-44, 2008

**Rozen P., Liphshitz I., Barchana M.**

The changing epidemiology of colorectal cancer and its relevance for adapting screening guidelines and methods

*Eur J Cancer*, 20(1):46-5, *Prev.* 2011

**Salavaggione O.E., Wa., Wiepert M., Yee V.C., Weinshilboum R.M.**

Thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics: variant allele functional and comparative genomics

*Pharmacogenet Genomics*, 15(11):801-15, 2005

**Saltz L.B., Lenz H.J., Kindler H.L., Hochster H.S., Wadler S., Hoff P.M., Kemeny N.E., Hollywood E.M., Gonen M., Quinones M., Morse M., Chen H.X.**

Randomized phase II trial of cetuximab, bevacizumab, and irinotecan compared with cetuximab and bevacizumab alone in irinotecan-refractory colorectal cancer: the BOND-2 study

*J Clin Oncol*, 25(29):4557-61, 2007

**Seip R.L., Duconge J., Ruano G.**

Implementing genotype-guided antithrombotic therapy

*Future Cardiol*, 6(3):409-24, 2010

**Snyder L.C., Astsaturov I., Weiner L.M.**

Overview of monoclonal antibodies and small molecules targeting the epidermal growth factor receptor pathway in colorectal cancer

*Clin Colorectal Cancer, 5 Suppl 2:S71-80, 2005*

**Van Cutsem E., Peeters M., Siena S., Humblet Y., Hendlisz A., Neyns B., Canon J.L., Van Laethem J.L., Maurel J., Richardson G., Wolf M., Amado R.G.**

Open-label phase III trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer

*J Clin Oncol, 25(13):1658-64, 2007*

**Voelkerding K.V., Dames S.A., Durtschi J.D.**

Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics

*Clin Chem, 55(4):641-58, 2009*

**Wei E.K., Wolin K.Y., Colditz G.A.**

Time course of risk factors in cancer etiology and progression

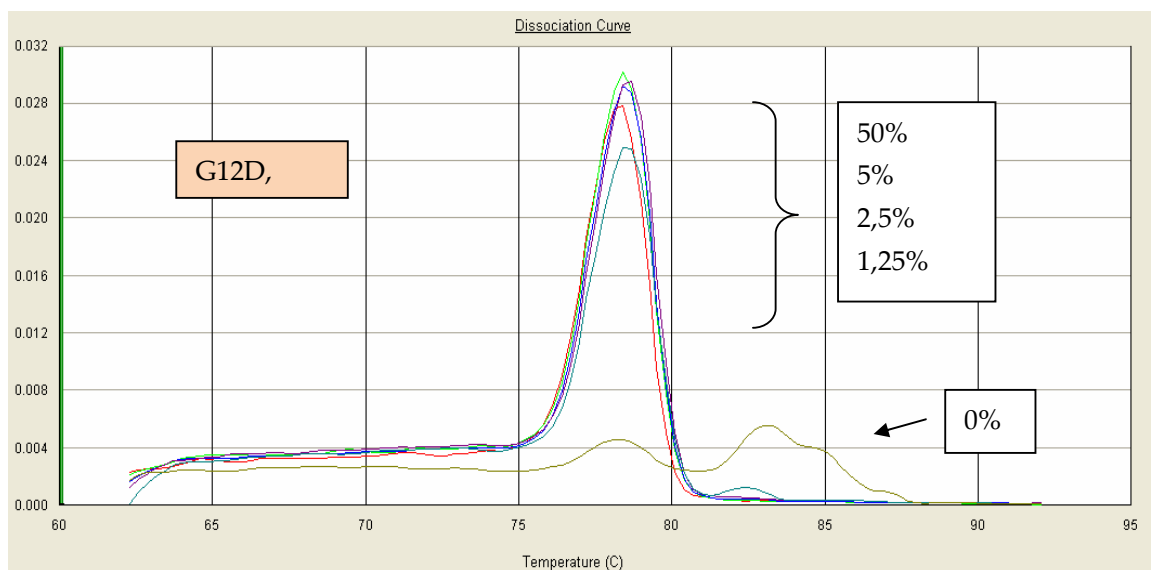
*J Clin Oncol, 28(26):4052-7, 2010*

**Yang X.D., Jia X.C., Corvalan J.R., Wang P., Davis C.G.**

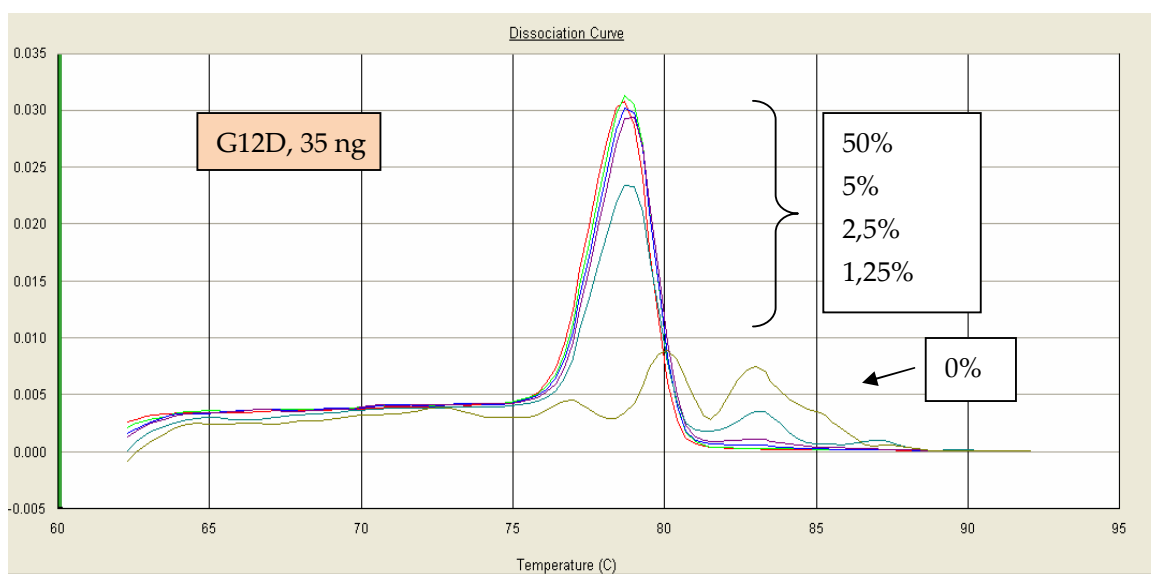
Development of ABX-EGF, a fully human anti-EGF receptor monoclonal antibody, for cancer therapy

*Crit Rev Oncol Hematol, 38(1):17-23, 2001*

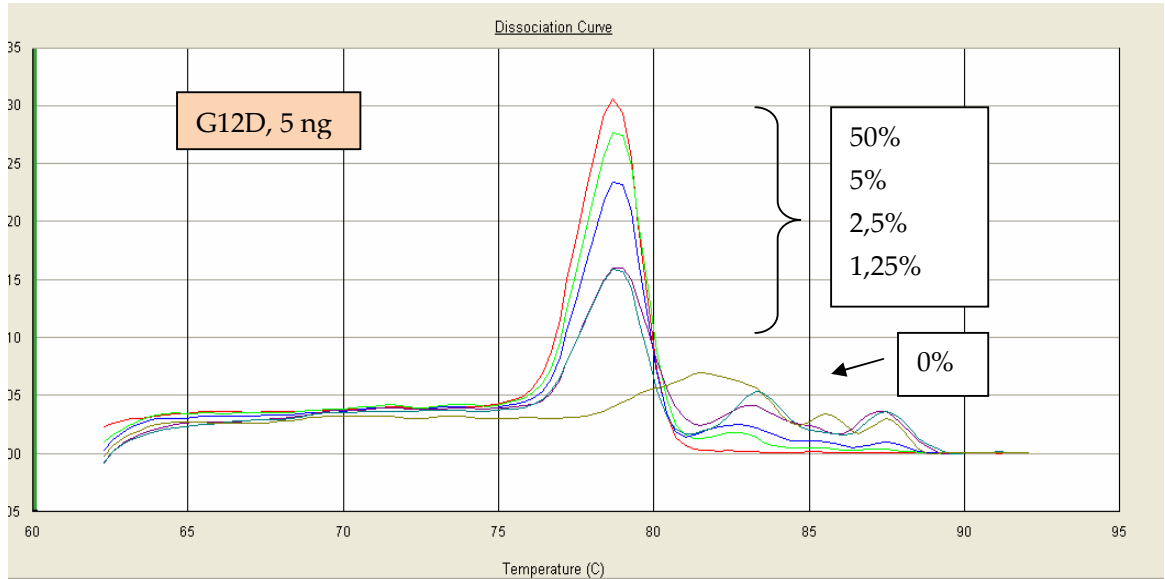
# Appendice



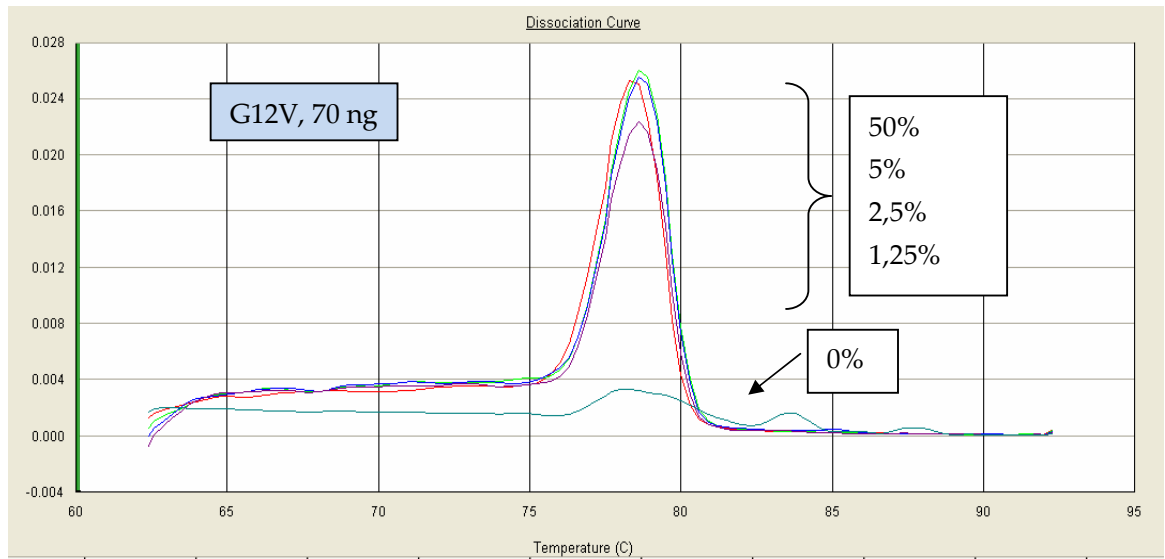
*Tabella 28 : curve di dissociazione G12D, background 70 ng*



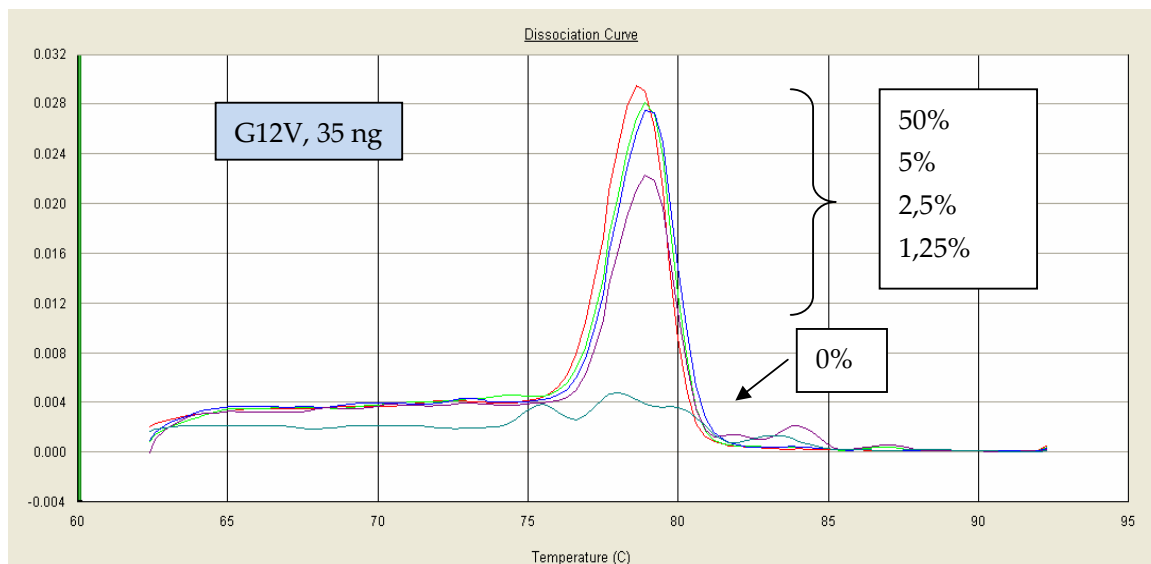
*Tabella 29 : curve di dissociazione G12D, background 35 ng*



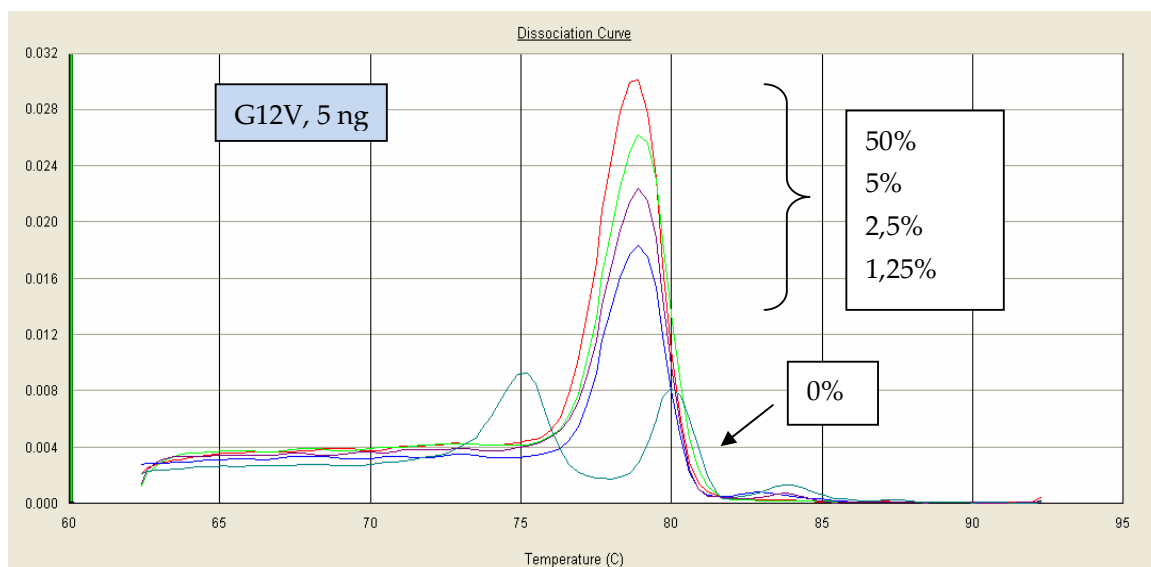
*Tabella 30 : curve di dissociazione G12D, background 5 ng*



*Tabella 31: curve di dissociazione G12V, background 70 ng*



**Tabella 32:** curve di dissociazione G12V, background 35 ng



**Tabella 33:** curve di dissociazione G12V, background 5 ng

### Experiment Name: SensAn\_G12D\_I\_151210

Well	Sample Name	% mutazione	ng/reazione	Ct	DCt (mut-TBXSA)
B2	G12D	50% mut	70	24,53	<b>3,00</b>
B3		5%mut	70	27,28	<b>5,69</b>
B4		2,5% mut	70	27,82	<b>6,45</b>
B5		1,25% mut	70	29,65	<b>8,02</b>
B6		0,5% mut	70	31,30	<b>9,67</b>
B7		0% mut	70	34,35	<b>12,73</b>
C2	TBXSA	50% mut	70	21,53	
C3		5%mut	70	21,59	
C4		2,5% mut	70	21,37	
C5		1,25% mut	70	21,63	
C6		0,5% mut	70	21,63	
C7		0% mut	70	21,62	
D2	G12D	50% mut	35	25,19	<b>2,88</b>
D3		5%mut	35	28,35	<b>5,90</b>
D4		2,5% mut	35	29,44	<b>7,12</b>
D5		1,25% mut	35	30,19	<b>7,69</b>
D6		0,5% mut	35	32,17	<b>9,68</b>
D7		0% mut	35	34,27	<b>11,72</b>
E2	TBXSA	50% mut	35	22,32	
E3		5%mut	35	22,45	
E4		2,5% mut	35	22,32	
E5		1,25% mut	35	22,50	
E6		0,5% mut	35	22,49	
E7		0% mut	35	22,55	
F2	G12D	50% mut	5	28,18	<b>2,92</b>
F3		5%mut	5	31,30	<b>5,87</b>
F4		2,5% mut	5	32,87	<b>7,50</b>
F5		1,25% mut	5	33,52	<b>8,10</b>
F6		0,5% mut	5	33,78	<b>8,41</b>
F7		0% mut	5	35,01	<b>9,56</b>
G2	TBXSA	50% mut	5	25,27	
G3		5%mut	5	25,43	
G4		2,5% mut	5	25,37	
G5		1,25% mut	5	25,42	
G6		0,5% mut	5	25,37	
G7		0% mut	5	25,45	

**Experiment Name: SensAnalG12V\_III\_141210**

Well	Sample Name	% mutazione	ng/reazione	Ct	DCt (mut-TBXSA)
B2	G12V	2,5% mut	70	30,29	<b>8,21</b>
B3		1,25% mut	70	31,39	<b>9,25</b>
B4		0,5% mut	70	32,20	<b>10,23</b>
B5		0% mut	70	36,03	<b>13,57</b>
C2	TBXSA	2,5% mut	70	22,08	
C3		1,25% mut	70	22,14	
C4		0,5% mut	70	21,97	
C5		0% mut	70	22,45	
D2	G12V	2,5% mut	35	30,31	<b>7,31</b>
D3		1,25% mut	35	31,82	<b>8,92</b>
D4		0,5% mut	35	33,59	<b>10,56</b>
D5		0% mut	35	36,47	<b>13,48</b>
E2	TBXSA	2,5% mut	35	23,01	
E3		1,25% mut	35	22,90	
E4		0,5% mut	35	23,03	
E5		0% mut	35	22,98	
F2	G12V	2,5% mut	5	33,09	<b>7,38</b>
F3		1,25% mut	5	33,59	<b>8,03</b>
F4		0,5% mut	5	35,33	<b>9,77</b>
F5		0% mut	5	36,88	<b>11,29</b>
G2	TBXSA	2,5% mut	5	25,70	
G3		1,25% mut	5	25,57	
G4		0,5% mut	5	25,56	
G5		0% mut	5	25,58	

# **Ringraziamenti**

Ringrazio la Professoressa Rosa Maria Gaion, la Signora Daniela Strafella, i dipendenti, i collaboratori, i tirocinanti e i clienti di AB ANALITICA per il supporto dato durante il periodo di Dottorato.