



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Farmacologia ed Anestesiologia "E. Meneghetti"

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN: Scienze Farmacologiche

INDIRIZZO: Farmacologia Molecolare e Cellulare

CICLO XXIII

FARMACOGENETICA DELL'IRINOTECANO IN ASSOCIAZIONE CON FLUOROPIRIMIDINE (FOLFIRI) NEL TRATTAMENTO DI PAZIENTI CON CARCINOMA COLONRETTALE METASTATICO.

Direttore della Scuola : Ch.ma Prof. Rosa Maria Gaion

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Pietro Giusti

Supervisore: Ch.mo Prof. Pietro Giusti

Supervisori Esterni: Ch.mo Dott. Giuseppe Toffoli

Ch.ma Dott.ssa Erika Cecchin

Dottoranda : Dott.ssa ELENA DE MATTIA

Il lavoro di questa tesi è stato effettuato presso la Struttura Operativa Complessa di Farmacologia Sperimentale e Clinica del Dipartimento di Oncologia Molecolare e Ricerca Traslazionale del Centro di Riferimento Oncologico di Aviano (Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico), sotto la direzione del Dott. Giuseppe Toffoli.

INDICE

ABBREVIAZIONI.....	1
RIASSUNTO.....	4
ABSTRACT.....	6
1. INTRODUZIONE.....	8
1.1 FARMACOGENETICA E CHEMIOTERAPIA DEI TUMORI.....	8
1.2. L'IRINOTECANO.....	14
• Sviluppo e struttura chimica.....	14
• Meccanismo d'azione.....	16
• Metabolismo.....	17
• Farmacocinetica.....	20
• Impiego clinico e tossicologia.....	22
1.3. L'IRINOTECANO NEL TRATTAMENTO DEL CARCINOMA COLONRETTALE METASTATICO.....	26
1.4 FARMACOGENETICA DELL'IRINOTECANO.....	27
1.4.1 METABOLISMO OSSIDATIVO (CYP3A4, CYP3A5).....	28
1.4.2 ELIMINAZIONE E DETOSSIFICAZIONE (UGT1A1, UGT1A7, UGT1A9).....	30
1.4.3 UPTAKE ED EFFLUSSO (MDR1, MRP1, MRP2, BCRP, OATP1B1).....	38
2. SCOPO DELLA TESI.....	56
3. MATERIALI E METODI.....	58
3.1 ARRUOLAMENTO DEI PAZIENTI, SOMMINISTRAZIONE DELLA CHEMIOTERAPIA E VALUTAZIONI CLINICHE.....	58
3.2 CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI.....	60
3.3 ESTRAZIONE DI DNA GENOMICO DA SANGUE INTERO.....	60
3.4 POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR).....	62
3.4.1 OTTIMIZZAZIONE DELLE CONDIZIONI DI PCR.....	67
3.5 ELETTROFORESI SU GEL D'AGAROSIO.....	71
3.6 METODICHE PER L'ANALISI DI POLIMORFISMI.....	73
3.6.1 ANALISI DEI FRAMMENTI.....	73
3.6.2 PYROSEQUENCING (PSQ).....	79
3.6.3 DISCRIMINAZIONE ALLELICA (METODO TaqMan®).....	86

3.7 METODICHE ANALITICHE IMPIEGATE PER LO STUDIO DEI POLIMORFISMI.....	91
3.7.1 ANALISI DEI POLIMORFISMI DI UGTs: UGT1A1, UGT1A7 e UGT1A9.....	91
3.7.2 ANALISI DEI POLIMORFISMI DEI TRASPORTATORI DI MEMBRANA: ABCB1, ABCC1, ABCC2, ABCG2 e SLCO1B1.....	96
3.7.3 ANALISI DEI POLIMORFISMI DEI CITOCROMI: CYP3A4 e CYP3A5.....	102
3.8 LINKAGE DISEQUILIBRIUM ED ANALISI APLOTIPICA.....	104
3.9 ANALISI FARMACOCINETICHE.....	106
3.10 ANALISI STATISTICA DEI DATI.....	108
4. RISULTATI.....	110
4.1 CARATTERISTICHE DEI PAZIENTI E TRATTAMENTO.....	110
4.2 GENOTIPIZZAZIONE DEI PAZIENTI.....	112
4.3 LINKAGE DISEQUILIBRIUM E DETERMINAZIONE APLOTIPICA.....	115
4.3.1 UGT1A.....	115
4.3.2 ABCB1.....	117
4.3.3 ABCC2.....	119
4.3.4 ABCG2.....	121
4.4 VALUTAZIONE CLINICA DELLA TOLLERANZA AL TRATTAMENTO.....	123
4.5 POLIMORFISMI GENICI E TOSSICITA'.....	125
4.5.1 TOSSICITA' EMATOLOGICA E NEUTROPENIA.....	125
4.5.2 TOSSICITA' NON EMATOLOGICA E DIARREA.....	130
4.6 VALUTAZIONE CLINICA DELLA RISPOSTA AL TRATTAMENTO.....	134
4.7 POLIMORFISMI GENICI E RISPOSTA TUMORALE.....	134
4.8 POLIMORFISMI GENICI, TEMPO ALLA PROGRESSIONE TUMORALE E SOPRAVVIVENZA.....	139
4.8.1 POLIMORFISMI GENICI E TEMPO ALLA PROGRESSIONE TUMORALE.....	139
4.8.2 POLIMORFISMI GENICI E SOPRAVVIVENZA.....	143
4.9 ANALISI FARMACOCINETICHE.....	146
4.9.1 POLIMORFISMI GENICI e RELAZIONI FARMACOCINETICHE.....	146
5. DISCUSSIONE.....	152
BIBLIOGRAFIA.....	176

ABBREVIAZIONI

3'UTR: (3' untranslated region) regione non tradotta al 3'

5'UTR: (5' untranslated region) regione non tradotta al 5'

5-FU: 5-fluorouracile

aa: amminoacido

ABC: ATP-binding cassette

ABCB1: ATP-binding cassette, sub-family B, member 1

ABCC1: ATP-binding cassette, subfamily C, member 1

ABCC2: ATP-binding cassette, subfamily C, member 2

ABCG2: ATP binding cassette, superfamily G, number 2

ANC: conta neutrofila assoluta

APC: 7-etil-10-[4-N-(5 acido aminopentanoico)-1-piperidino] carbonilossi-camptotecina

APS: adenosina 5' fosfosulfato

AUC: area sotto la curva

BI: biliary index [CPT-11 AUC X (SN38 AUC/SN38G AUC)]

BRCP: breast cancer resistance protein

C.R.O.: centro di riferimento oncologico

CCD: charged-coupled device

CCR: carcinoma colon rettale

CI: confidence interval (intervallo di confidenza)

Cmax: concentrazione massima

cMOAT: canalicular multispecific organic anion transporter

CPT-11: 7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino]carbonyloxycamptothecin o irinotecano

CR: complete response (risposta completa)

CSF: colony-stimulating factor (fattore stimolante colonia)

CYP: citocromo

CYP450: citocromo P450

dATP: deossadeninatrifosfato

dATP α S: deossadenosina alfa-tio trifosfato

dCTP: deossicitosinatrifosfato

dGTP: deossiguaninatrifosfato

DJS: dubin-johnson sindrome

DMSO: dimetilsolfossido

DNA: acido desossiribonucleico

dNTP: deossinucleotiditrifosfato

DPD: diidropirimidina deidrogenasi

dTTP: deossitiminatrifosfato

E217 β G: 17 β estradiol17 β (d)glucoronide

EDTA: acido etilendiaminotetracetico

EGFR: epidermal growth factor receptor
EMEA: european agency for the evaluation of medicinal products
FDA: food and drug administration
FOLFIRI: 5-fluoro uracile in infusione continua / leucovorina/ irinotecano
GR: glucuronidation ratio (SN-38G AUC/SN-38 AUC)
GSH: glutatione ridotto
GST: glutatione-S-trasferasi
hCES: human carbosil esterasi
HEX: isomero libero dell'estere succimidilico della 6-carbossi-2',4,4',5',7,7'-esaclorofluorescina
HPLC: cromatografia liquida ad alte prestazioni
HUGO: human genome organization
HWE: equilibrio di Hardy-Weinberg
IFL: 5-fluoro uracile in bolo/ leucovorina/ irinotecano
IIPGA: Innate Immunity Programs (in Heart, Lung and Blood Disease) for Genomic Applications
LCT4: leucotriene C4
LD: linkage disequilibrium
LV: leucovorina
MDR1: multidrug resistance 1
mRNA: acido ribonucleico messaggero
MRP1: multidrug resistance-associated protein 1
MRP2: multidrug resistance-associated protein 2
MRPs: multidrug resistance-associated proteins
MST: median survival time (tempo di sopravvivenza mediano)
MTHFR: 5,10-metilentetraidrofolato reduttasi
NAT: N-acetil trasferasi
NBD: nucleotide-binding domain (dominio legante nucleotide)
NCBI: national center of biotechnology information
NCI-CTC: national cancer institute-common toxicity criteria
NPC: 7-etil-10-(4-amino-1-piperidino)carbonilossi-camptothecina
NSCLC: non-small cell lung cancer (tumore ai polmoni non a piccole cellule)
OATP: organic anion transporting polypeptide
OATP1B1: organic anion-transporting polypeptide 1B1
OATP-C: organic anion transporting polypeptide-C
OR: odds ratio
OS: overall survival (sopravvivenza globale)
p: p-value
PCR: polymerase chain reaction
PD: progression disease (malattia in progressione)
PFS: progression free survival (sopravvivenza libera da progressione di malattia)
P-gp: glicoproteina-P

PK: Pharmacokinetic (farmacocinetica)
PNK: polynucleotide kinase
PPi: pirofosfato
PR: partial response (risposta parziale)
PSQ: pyrosequencing
PXE: pseudoxanthoma elasticum
PXR: pregnane X receptor
REC : relative extent of conversion (estensione relativa di conversione)
RFLP: restriction fragment length polymorphism.
RNA: acido ribonucleico
RR: response rate (grado di risposta tumorale)
SCLC: small cell lung cancer (tumore ai polmoni a piccole cellule)
SD: stable disease (malattia stabile)
SDS: sodiododecilsolfato
SE: standard error
SLCO1B1: solute carrier organic anion transporter family, member 1B1
SN-38: 7-etil-10-idrossi-camptotecina o camptotecina semisintetica
SN-38G: 7-etil-10-idrossi-camptotecina-glucuronato o camptotecina semisintetica glucuronata
SNC: sistema nervoso centrale
SNP: single nucleotide polymorphism (polimorfismo di un singolo nucleotide)
STR: short tandem repeats
SULTs: sulfottransferasi
T_a: temperatura di annealing
TA: timina adenina
TAE: tris-acetato-EDTA
TC: tomografia computerizzata
TF: fattore di trascrizione
T_m: temperatura di melting
TMD: trans-membrane domain (dominio transmembrana)
TOPO I: topoisomerasi I
TPMT: tiopurina S-metiltransferasi
TS: timidilato sintetasi
TTP: time to progression (tempo alla progressione)
UGT: uridindifosfato (UDP)-glucuronosiltrasferasi
VEGF: vasal epidermal growth factor
WHO: world health organisation
WT: wild-type

RIASSUNTO

La farmacogenetica studia il ruolo dei polimorfismi genici nel determinare la variabilità interindividuale che si osserva nell'esito clinico di un trattamento farmacologico sia in termini di tossicità che di efficacia della terapia.

L'irinotecano (CPT-11) è un profarmaco, derivato semisintetico della campotecina, che agisce come inibitore della topoisomerasi I. Tale composto, impiegato per il trattamento del carcinoma colonrettale (CCR) metastatico, nonostante la sua provata efficacia antitumorale, presenta degli effetti tossici particolarmente significativi, sia di tipo ematologico (neutropenia) che non ematologico (diarrea), ed una notevole variabilità intersoggettiva nella risposta al trattamento. L'irinotecano presenta un complesso pathway metabolico i cui steps principali sono: 1) attivazione di CPT-11 a SN-38 (hCES1, hCES2); 2) ossidazione di CPT-11 a derivati non farmacologicamente attivi, APC e NPC (CYP3A4, CYP3A5); 3) detossificazione tramite glucuronazione di SN-38 (UGT1A1, UGT1A7, UGT1A9); 4). escrezione ed uptake cellulare del farmaco e dei suoi metaboliti (OATP1B1, MDR1, MRP1, MRP2, BCRP). Per alcune di queste proteine, sono stati descritti diversi polimorfismi genici fenotipicamente importanti. In particolare, nel mondo scientifico e a livello degli organi regolatori internazionali del farmaco, grande attenzione è stata posta sul ruolo della variante UGT1A1*28 come marker predittivo dell'esito della terapia con irinotecano ipotizzando un suo utilizzo per la definizione di una terapia personalizzata. In questo ambito il nostro gruppo ha prodotto importanti risultati che sottolineano la rilevanza di questo determinante genico (*Toffoli G et al. JCO 2010, Cecchin E et al. JCO 2009, Toffoli G et al. JCO 2006*). Lo scopo di questa tesi è quello di ampliare l'analisi farmacogenetica dell'irinotecano, definendo l'impatto di varianti geniche dei citocromi, degli UGT1As e dei trasportatori nel modulare l'outcome del trattamento con FOLFIRI (CPT-11, 5-fluorouracile, acido folico), in pazienti con CCR metastatico, in rapporto al polimorfismo UGT1A1*28. L'analisi, di tipo retrospettivo, è stata condotta su 250 pazienti caucasici affetti da CCR metastatico omogeneamente trattati con regime FOLFIRI, sui quali è stato effettuato un monitoraggio farmacogenetico e clinico. 71 individui sono stati inclusi nell'analisi farmacocinetica. I pazienti sono stati analizzati per un set di 50 polimorfismi di geni coinvolti nel metabolismo ossidativo, nel processo di glucuronazione e nei meccanismi di trasporto. La genotipizzazione è stata realizzata tramite Pyrosequencing, discriminazione allelica (tecnologia TaqMan) e analisi dei frammenti. Tramite strumenti bioinformatici è stato effettuato anche uno studio di linkage disequilibrium ed aplo-tipico. 71 pazienti sono stati analizzati per la farmacocinetica

tramite metodiche di HPLC, e i parametri farmacocinetici sono stati calcolati adottando un modello non-compartimentale. I dati clinici di tossicità (scala NCI-CTC) e di risposta (criteri WHO) alla terapia, sono stati monitorati durante tutta la durata dello studio. I pazienti sono stati seguiti al follow-up in modo da valutare il dato di tempo alla progressione tumorale (TTP) e sopravvivenza (OS). Tramite un'analisi univariata e multivariata si è valutato, quindi, il ruolo dei vari marker genici nell'influenzare: 1) la tossicità ematologica e non ematologica, acuta (primo ciclo di terapia) e cumulativa (intero corso del trattamento), con particolare attenzione alla neutropenia e diarrea; 2) clinical benefit (CB) e response rate (RR); 3) TTP e OS; e 4) profilo farmacocinetico di CPT-11, SN-38 e SN-38G.

Il lavoro di questa tesi ha permesso di determinare, assieme ai classici fattori clinico-demografici, nuovi marcatori genetici dell'outcome clinico della terapia effettuata con regime FOLFIRI. In particolare si sono identificati i seguenti determinati genici 1) *Tossicità ematologica (neutropenia)*: un rischio differenziale di sviluppare effetti avversi acuti e/o cumulativi si è dimostrato essere associato a varianti di UGT1A (UGT1A7*3, UGT1A9*22, UGT1A aplotipo I) e dei trasportatori ABCC1 (1303C>A), ABCC2 (aplotipo II) e ABCG2 (aplotipo I) 2) *Tossicità non ematologica (diarrea)*: un ruolo predittivo importante è stato evidenziato per alcuni markers genici dei trasportatori con un maggior rischio di eventi avversi acuti e/o cumulativi correlato a ABCC1 (1684C>T, IVS18-30G>C) e ABCG2 (15994G>A) e, al contrario, un minor rischio associato a ABCC2 (1023G>A) 3) *Risposta tumorale*: UGT1A1*28 è risultato l'unico determinante genetico predittivo del CB; lo stesso polimorfismo assieme ad altri markers genetici di UGT1A (aplotipo II) e di proteine trasportatrici ABCC1 (2012G>T), ABCC2 (1249G>A, aplotipo II), ABCG2 (-15622C>T, ABCG2 -15994G>A, aplotipo III) e OATP1B1 (-11187G>A), sono risultati significativi nel modulare la risposta obbiettiva alla terapia. 4) *TTP*: un ruolo prognostico è stato dimostrato per UGT1A1*28 e UGT1A aplotipo II, entrambi correlati con un minor rischio di andare incontro a progressione di malattia. Un supporto ai risultati ottenuti è derivato dall'analisi farmacocinetica. Il lavoro ha consentito, inoltre, di valutare e confermare la validità dell'approccio aplotipico.

In conclusione, il lavoro di questa tesi ha permesso di definire nuovi marker genici legati al trasporto del farmaco confermando l'impatto clinico delle varianti di UGT1A sull'outcome del trattamento, con particolare riferimento alla risposta tumorale e al TTP. La validazione dei risultati ottenuti potrà fornire agli oncologi clinici uno strumento utile per ottimizzare e personalizzare la terapia di pazienti con CCR metastatico trattati con irinotecano in regime FOLFIRI.

ABSTRACT

Pharmacogenetics focuses on intersubjects variability in therapeutic drug effects and toxicity depending on genetic polymorphisms.

The prodrug irinotecan (CPT-11) is a camptothecin analogue exerting its antitumor efficacy by inhibiting topoisomerase I. This compound, used for a variety of malignancies as the metastatic colorectal cancer (CRC), is characterized by a, sometimes unpredictable, severe haematological (neutropenia) and non haematological (diarrhea) toxicity and by a significant intersubjects variability in the response to the treatment, despite the established antineoplastic efficacy. The metabolic pathway of irinotecan is complex and the main steps are: 1) activation of CPT-11 to SN-38 (hCES1 and 2); 2) oxidation of CPT-11 to minor inactive metabolites APC and NPC (CYP3A4 and CYP3A5); 3) detoxification by glucuronidation of SN-38; (UGT1A1, UGT1A7 and UGT1A9); 4) cellular uptake and excretion of the irinotecan and its metabolites (OATP1B1, MDR1, MRP1, MRP2 and BCRP). Polymorphic sequences in the genes encoding for some of these proteins have been described. In particular, scientific research and international drug agencies have focused on the role of UGT1A1*28 polymorphism as predictive marker of irinotecan therapy outcome, suggesting its possible use for personalizing the treatment. On this ground, our group have generated important results that underline and confirm the relevance of this genetic determinant (*Toffoli G et al. JCO 2010, Cecchin E et al. JCO 2009, Toffoli G et al. JCO 2006*). Aim of this study was to expand the pharmacogenetic analysis defining the impact of genetic polymorphisms of cytochromes, UGT1As and transporters related genes, in determining the outcome of irinotecan therapy in metastatic CRC patients, in relation to UGT1A1*28 variant. The retrospective analysis was conducted on 250 Caucasian patients with metastatic CRC, homogeneously treated with an irinotecan including regimen (irinotecan, 5-fluorouracil and folinic acid, FOLFIRI regimen), undergoing pharmacogenetic and clinical monitoring; 71 of them were also investigated for pharmacokinetics. A set of 50 genetic polymorphisms, involved in oxidative metabolism, glucuronidation pathway and transport of the drug and its metabolites were investigated, inferring genotypes/diplotypes to each patient. Genotyping was performed by Pyrosequencing, allelic discrimination (TaqMan technology), and fragment analysis. Bioinformatic tools were employed to perform linkage disequilibrium and haplotype investigation. Moreover, 71 patients underwent pharmacokinetic analysis by HPLC, and the pharmacokinetics parameters were calculated adopting the non-compartmental model. Clinical parameters of toxicity (by NCI-CTC scale) and response to the therapy (by WHO

criteria) were monitored all along the study. Follow-up of the patients was carried out in order to collect data about time to progression (TTP) and overall survival (OS). Univariate and multivariate analyses were performed to discover possible significant association of the genetic variants with 1) acute (first cycle) and overall (entire course of therapy) haematological and non haematological toxicity, particularly neutropenia and diarrhea, 2) clinical benefit (CB) and response rate (RR), 3) TTP and OS, and 4) pharmacokinetics profile of CPT-11, SN-38 e SN-38G.

This study highlighted a set of genetic markers that, in combination with classic clinico-demographic factors, could predict the clinical outcome of the FOLFIRI treatment. In particular, the following genetic determinants were identified 1) *hematological toxicity (neutropenia)*: a differential risk of developing acute and/or cumulative toxic effects correlated with the genetic variants of UGT1A (UGT1A7*3, UGT1A9*22, UGT1A haplotype I) and transporters ABCC1 (1303C>A), ABCC2 (haplotype II) and ABCG2 (haplotype I) genes; 2) *haematological toxicity (diarrhea)*: an important predictive role was highlighted for genetic markers of membrane carriers with an increased risk to develop acute and/or cumulative adverse events for polymorphisms of ABCC1 (1684C>T, IVS18-30G>C) and ABCG2 (15994G>A) and, on the contrary, a lower risk for ABCC2 1023G>A; 3) *Tumour response*: UGT1A1*28 emerged as the only genetic determinant of CB, and it was also associated to response rate together with other genetic markers of UGT1A (haplotype II) and transporters ABCC1 (2012G>T), ABCC2 (1249G>A, haplotype II), ABCG2 (-15622C>T, ABCG2 -15994G>A, haplotype III) and OATP1B1 (-11187G>A); 4) *TTP*: UGT1A1*28 and UGT1A haplotype II correlated with longer TTP.

An essential support to the results obtained in this work, derived from the pharmacokinetic analysis. Moreover, this pharmacogenetic study validated the efficacy of haplotype approach. In conclusion, in this work of thesis, an innovative predictive role for several genetic markers of membrane transporters was defined and the predominant clinical impact of UGT1A variants, in particular on antitumour efficacy and TTP, was confirmed. After validation in prospective studies, a possible application of these parameters in the clinical practice will be useful to design a tailored FOLFIRI treatment based on peculiar characteristics of each metastatic CRC patient.

1. INTRODUZIONE

1.1 FARMACOGENETICA E CHEMIOTERAPIA DEI TUMORI

La variabilità intersoggettiva, che si osserva nell'efficacia e nella tossicità dei farmaci antitumorali impiegati nella chemioterapia del tumore, può essere determinata da diversi fattori: fisiologici (età, sesso), patologici (es. malattie concomitanti, natura del tumore), ambientali (es. dieta, interazione tra farmaci o altri composti chimici) e genetici. La farmacogenetica è quella branca della farmacologia che studia proprio come i fattori genetici possano influenzare l'esito di un trattamento chemioterapico. In particolare, lo scopo di una analisi farmacogenetica è quello di individuare quelle variazioni della sequenza nucleotidica del DNA che possono influenzare l'effetto terapeutico del farmaco o la predisposizione alla comparsa di effetti indesiderati.

Oggetto di studio della farmacogenetica sono i polimorfismi genici ovvero alterazioni stabili nella sequenza del DNA che interessano più dell'1% della popolazione. Il tipo più semplice e frequente di polimorfismo coinvolge un unico nucleotide (single-nucleotide polymorphism, SNP) e porta all'alterazione di un'unica base nella sequenza del DNA; tale evento, nel genoma umano, si verifica approssimativamente ogni 1000 basi. Un altro tipo di polimorfismo è rappresentato dai minisatelliti che sono costituiti da un numero variabile di ripetizioni in tandem, derivanti da una sequenza di DNA (0,1-10kb) ripetuta in molteplice copia. Esiste inoltre una versione più semplice e più comune dei minisatelliti rappresentata dai microsatelliti che sono caratterizzati dalla ripetizione in tandem di due o quattro nucleotidi al massimo. Infine tra le variazioni polimorfiche possiamo trovare le inserzioni o delezioni che sono costituite dall'aggiunta o perdita nella sequenza genomica di una porzione di nucleotidi di dimensione variabile. I polimorfismi sono definiti: "Nonsense" quando sostituzioni di singole basi portano alla comparsa di un codone di stop e alla terminazione prematura della sintesi della proteina; "Missense" o "Non-synonymous" quando, invece, generano l'incorporazione di un amminoacido inappropriato nella proteina; ed infine "Frameshift" quando determinano uno slittamento nella cornice di lettura durante la fase di traduzione della proteina. Dal punto di vista fenotipico, tali variazioni geniche possono andare ad alterare o a rendere del tutto silente la normale attività del gene o del suo prodotto proteico. In particolare, quando l'evento mutageno coinvolge la regione codificante del gene si ha una aberrazione strutturale nella proteina prodotta con conseguente alterazione nella sua funzionalità; se la

variazione polimorfica cade, invece, nelle regioni regolatrici, come il promotore del gene o le zone enhancer in zone non tradotta in 5' (5'UTR) e 3' (3'UTR) , oppure va a modificare i normali processi di trascrizione, traduzione e splicing del RNA si ha una variazione nella quantità di proteina prodotta. Esiste poi un'altra tipologia di variazione genica definita "(Same) Sense" o "Synonymous" costituita da un cambiamento del DNA silente ovvero che, a causa della parziale ridondanza del codice genetico, non comporta nessuna alterazione della sequenza degli aminoacidi e non ha, pertanto, conseguenze strutturali o funzionali evidenziabili.

I polimorfismi sono varianti a livello genico compatibili con una vita del tutto normale che possono però rendersi evidenti in situazioni di particolare stress per l'individuo, come ad esempio l'esposizione a farmaci chemioterapici. Questo succede quando l'alterazione genetica va a modificare la quantità sintetizzata o la funzionalità di proteine coinvolte proprio nella cascata di eventi di cui è protagonista il farmaco antitumorale, influenzando di conseguenza l'efficacia e la tossicità dello stesso. Nel determinare l'esito di un trattamento chemioterapico, modulando sia aspetti farmacodinamici che farmacocinetici, si è visto essere importanti soprattutto i polimorfismi di geni codificanti per proteine coinvolte nel trasporto, nel metabolismo e nel meccanismo d'azione del farmaco [1, 2, 3, 4, 5, 6]. Per quanto riguarda il trasporto sono stati largamente studiati i trasportatori appartenenti alla famiglia delle ATP-binding cassette (ABC) proteins e del Organic anion-transporting polypeptide (OATP), coinvolti nei meccanismi di entrata ed estrusione dalla cellula di numerosi farmaci antitumorali. Diversi studi hanno evidenziato come una loro alterazione possa influenzare la biodisponibilità del farmaco substrato. I polimorfismi genici di enzimi coinvolti nel metabolismo del farmaco vanno, invece, ad alterare principalmente la sua attivazione/inattivazione modulando così l'esposizione (intra ed extra cellulare) al farmaco stesso. Tali proteine si possono distinguere in enzimi che promuovono le reazioni di fase I o di funzionalizzazione (reazioni quali ossidazione, riduzione o idrolisi che inseriscono o liberano gruppi funzionali) ed enzimi che promuovono reazioni di fase II o di coniugazione (reazioni di coniugazione dei prodotti di fase I o di altri composti con un substrato endogeno, quale glutatione, acido glucuronico o acido acetico, per formare derivati più polari che possono essere poi escreti per via biliare o renale). Gli enzimi di fase I di interesse farmacogenetico sono soprattutto i citocromi i quali sono coinvolti sia nei processi di detossificazione che di attivazione del farmaco. Fra gli enzimi di fase II di interesse farmacogenetico vengono invece inclusi l'UDP-glucuronosiltrasferasi (UGT), il glutatione-S-trasferasi (GST), la tiopurina S-metiltransferasi (TPMT), la Sulfotransferasi (SULTs) e l'N-

acetil trasferasi (NAT). Infine i polimorfismi genici di proteine coinvolte nel meccanismo d'azione del farmaco possono influenzare l'efficacia dello stesso e quindi la vitalità della cellula. Tali variazioni possono alterare, ad esempio, la formazione del complesso farmaco-molecola target, in quanto comportano un cambiamento strutturale o una overproduzione dello stesso target; per i farmaci che agiscono creando un danno al DNA, come i derivati del platino, può essere, invece, più significativa un'alterazione nell'attività delle proteine del riparo.

L'esistenza di tali polimorfismi genici si può riflettere alla fine in una notevole variabilità interindividuale sia in termini di risposta al farmaco chemioterapico che di tossicità della terapia. Uno studio di farmacogenetica è teso proprio ad analizzare la correlazione tra genotipo e fenotipo del paziente, allo scopo di definire la relazione esistente tra un determinato polimorfismo e l'alterazione dell'effetto del farmaco che ne consegue, individuando in tal modo validi markers genici predittivi di possibile impiego clinico.

Esistono essenzialmente tre approcci impiegati nelle analisi di farmacogenetica [6, 7]: quello basato sullo studio di un singolo gene (Candidate gene approach) che è considerato fondamentale per il meccanismo biologico del farmaco sotto indagine; quello costituito dall'analisi di diversi geni tutti funzionalmente implicati nel pathway metabolico e d'azione del farmaco (Candidate-pathway-gene or Pathway-based approach); ed, infine, quello rappresentato da uno studio globale dell'intero genoma umano (Genome-wide approach). I vantaggi e svantaggi di ciascun tipo di approccio sono riportati in Tabella 1.1. In particolare, nel lavoro di questa tesi è stato adottato il secondo metodo ovvero quello basato sullo studio di un set di polimorfismi relativi a geni codificanti per proteine che sono state dimostrate essere significativamente coinvolte nel pathway metabolico e nel meccanismo di azione del farmaco sotto indagine. Tale scelta è in linea con gli studi di farmacogenetica pubblicati negli ultimi anni che prevedono generalmente un approccio poligenico, effettuando analisi simultanee di polimorfismi in multipli geni o di multiple variazioni nucleotidiche all'interno di un particolare gene, elaborando poi i dati ottenuti tramite studi di Linkage Disequilibrium (LD) e tramite la determinazione di aplotipi funzionalmente e fenotipicamente significativi [2, 4, 5, 6]. Questo approccio poligenico risulta sicuramente più completo e più valido rispetto all'analisi del singolo polimorfismo; spesso, infatti, soprattutto tra i membri di una stessa famiglia di trasportatori o di enzimi metabolici, esiste una importante sovrapposizione di specificità di substrato che può portare al mascheramento dell'effetto di una variazione genica da parte di un'altra con effetto compensatorio; inoltre la chemioterapia è spesso costituita da regimi polichemioterapici che prevedono l'impiego di più farmaci, ognuno dei quali ha un

pathway d'azione e proteine coinvolte in questo diverse fra loro. La complessità aggiunta da un approccio di tipo poligenico è stata superata grazie al recente sviluppo di nuove metodiche di genotipizzazione altamente automatizzate e di software bioinformatici dedicati a tale tipo di indagini.

L'obiettivo finale di una analisi farmacogenetica è quello di riuscire a prevedere, attraverso l'analisi in via preliminare delle caratteristiche genetiche del singolo paziente, l'effetto terapeutico e la tossicità del farmaco impiegato, permettendo così una ottimizzazione ed individualizzazione della terapia. In campo oncologico la personalizzazione del trattamento chemioterapico è sicuramente un obiettivo molto importante. In molteplici studi si è evidenziato, ad esempio, che la somministrazione della stessa dose di un dato farmaco antitumorale in una popolazione di pazienti risulta spesso in un vasto range di tossicità che, in alcuni casi, può risultare addirittura letale. Inoltre tali farmaci presentano un basso indice terapeutico, che è il rapporto fra la minima dose efficace e la massima dose tollerata, e vengono generalmente utilizzati proprio alla massima dose tollerata; ciò comporta evidentemente un alto rischio di sviluppare effetti avversi per quella sottopopolazione di individui geneticamente predisposta che presenta un alterato metabolismo del farmaco. Attualmente la dose di un agente chemioterapico viene decisa in base alla superficie corporea ma ciò non è sicuramente sufficiente per superare le differenze interindividuali che si osservano nell'esito del trattamento [2, 4, 7, 8, 9]. Inoltre anche la scelta del tipo di farmaco da impiegare viene spesso effettuata su base empirica e, nella pratica clinica, si può constatare come pazienti, con lo stesso tipo di tumore, non sempre rispondano in modo ugualmente positivo al medesimo farmaco [2, 4, 7, 8, 9]. Tutto ciò comporta un danno per il paziente, che non viene adeguatamente curato, ed un inutile dispendio economico per l'intera società. Alla luce di queste considerazioni si può, quindi, dire che la caratterizzazione genetica di ciascun paziente faciliterebbe sicuramente l'individuazione, caso per caso, del protocollo di trattamento più idoneo.

I farmaci antitumorali sono sostanze naturali o di sintesi che, agendo tramite diversi meccanismi, provocano infine la morte della cellula e presentano una bassa selettività in quanto sono citotossici per tutte le cellule in duplicazione, sia tumorali che normali (epiteliali, midollari, bulbi piliferi). Bisogna sottolineare che l'efficacia della terapia può essere influenzata dalle caratteristiche genetiche soprattutto della cellula tumorale, in quanto queste la rendono più o meno sensibile all'azione del farmaco; il grado di tossicità può essere determinato, invece, dalle caratteristiche genetiche soprattutto della cellula dell'organismo ospite, la quale può risultare diversamente sensibile all'effetto citotossico del farmaco. E'

importante fare tale distinzione in quanto la cellula tumorale, a causa della sua elevata instabilità genetica, sviluppa spesso alterazioni geniche somatiche addizionali che portano il suo genotipo a differire da quello germinale delle cellule non-tumorali; ciò può spiegare anche lo sviluppo di fenomeni di farmacoresistenza durante il corso della terapia [4, 8]. Gli studi di farmacogenetica, per la maggior parte, si basano essenzialmente sull'analisi delle caratteristiche genetiche germinali ricavate a partire da campioni di sangue periferico.

Sicuramente la farmacogenetica presenta attualmente ancora diversi limiti, fra i quali, il più evidente è la mancanza di validazione clinica dei dati ottenuti dovuta all'eterogeneità e a volte conflittualità che emerge quando si vanno a confrontare fra loro i risultati riportati in diversi studi. Tale discrepanza può essere dovuta a diversi fattori [4, 5, 10]: differenze nel disegno dello studio (es. retrospettivo/prospettico, basso potere statistico), scarsa numerosità del campione d'indagine non idoneo a valutare l'effetto di polimorfismi a bassa penetranza o per valutare l'importanza di un approccio atipico con il rischio di generare falsi positivi/negativi, diversità nel setting clinico e nello schema di trattamento (es. dose e modalità di somministrazione del farmaco, coamministrazione di altri agenti chemioterapici), eterogeneità nella patologia tumorale (es. stadio della malattia, localizzazione, pretrattamento) e nelle caratteristiche cliniche e demografiche dei pazienti (es. malattie concomitanti, performance status, età, sesso), incapacità di controllare fattori ambientali confondenti (consumo di alcool, fumo, dieta) ed, infine, differenza nelle tecniche sperimentali impiegate per la determinazione dei polimorfismi e nei parametri e metodi di misura dell'outcome clinico. Considerata la diversa prevalenza dei polimorfismi nei diversi gruppi etnici, anche l'origine della popolazione di studio è un aspetto fondamentale [11]. Per individuare validi marker genetici di uno specifico trattamento chemioterapico impiegato in una determinata patologia tumorale, è importante, quindi, condurre studi farmacogenetici multicentrici prospettici metodologicamente ben definiti usando una popolazione di pazienti adeguatamente numerosa e il più uniforme possibile dal punto di vista clinico, demografico e comportamentale. Inoltre la validazione dei dati ottenuti deve essere necessariamente effettuata su molteplici casistiche tra loro indipendenti.

L'integrazione dei risultati derivanti dagli studi di farmacogenetica così strutturati è sicuramente una valida strategia per giungere infine all'individualizzazione della terapia antitumorale e per ottenere così da ogni trattamento la massima efficacia e la minima tossicità, scegliendo il farmaco più idoneo e la dose ottimale per il singolo individuo. L'applicazione degli studi farmacogenetici in campo oncologico sta inoltre recentemente assumendo un'importanza strategica sia in ambito scientifico strettamente legato alla ricerca che per gli

Organismi Regulatori (FDA, EMEA) adibiti ad esempio all'esame della scheda tecnica [6, 7, 9].

Tabella 1.1: Comparazione tra i tre approcci impiegati negli studi di farmacogenetica

	VANTAGGI	SVANTAGGI
GENE SINGOLO (candidate gene approach)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ facile interpretazione dell'ipotesi di studio e dei risultati; necessità di un piccolo campione, semplicità dell'analisi, assenza di problemi di comparazioni multiple; ▪ basso costo, facile da validare. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ approccio limitato e ristretto dalle nostre attuali conoscenze sulla funzione di gene e polimorfismo e sui pathways metabolici del farmaco; ciò può portare a tralasciare e perdere i veri geni candidati e relativi polimorfismi; ▪ basso valore predittivo per tratti poligenici; ▪ non considerazione delle interazioni gene/gene;
PATHWAY (pathway-based approach)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ più elevata potenza predittiva dell'approccio singolo gene; ▪ considerazione di interazioni gene/gene in tratti poligenici; ▪ associazioni individuate più significative dal punto di vista biologico. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ approccio limitato dalle nostre attuali conoscenze. ▪ necessità di un campione più grande; ▪ assunzione del principio di un uguale contributo da parte di ciascun gene e allele; ▪ difficoltà di testare biologicamente le interazioni gene/gene emerse; ▪ validazione più difficoltosa.
GENOME-WIDE (genome-wide scanning)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ possibilità di generare un'ipotesi di studio indipendente dalle attuali conoscenze con quindi la potenzialità di identificare nuovi marcatori; ▪ imparziale e non pregiudizievole valutazione globale di geni e polimorfismi che può rivelare interazioni gene/gene 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ possibilità di falsi positivi; ▪ necessità di un campione veramente molto grande; ▪ analisi statistiche sofisticate; ▪ alti costi.

1.2 L'IRINOTECANO

Sviluppo e struttura chimica

L'irinotecano (Camptosar™; Campto®) è un profarmaco appartenente alla classe degli inibitori della topoisomerasi I (TOPO I) utilizzato principalmente per il trattamento del cancro colonrettale (CCR) metastatico.

L'irinotecano (7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino]carbonyloxycamptothecin; (CPT-11) è un derivato semisintetico della camptotecina [12], un alcaloide isolato negli anni sessanta dalla *Camptotheca Acuminata* [13]; tale alcaloide si è visto essere caratterizzato da una buona attività antiproliferativa, ma anche da una insolubilità in acqua tale da produrre effetti tossici così severi ed imprevedibili da portare presto alla sospensione del suo sviluppo clinico [13]. La delucidazione del meccanismo di azione di questa sostanza naturale, ovvero l'inibizione della TOPOI, un enzima indispensabile per lo svolgimento del DNA durante le fasi di trascrizione e replicazione, ha tuttavia riacceso, in seguito, l'interesse verso tale molecola portando alla sintesi e sperimentazione clinica di diversi derivati, ottimizzati man mano per le loro proprietà farmacologiche e caratterizzati in vivo ed in vitro da un largo spettro di attività antitumorale [13].

La struttura chimica della camptotecina (Figura 1.1.a), da cui l'irinotecano deriva, presenta un sistema planare pentaciclico avente uno stereocentro asimmetrico sul carbonio in posizione 20 dell'anello E, caratterizzato dalla configurazione S. Il complesso costituito dai cinque anelli include una metà pirrolo[3,4-b]chinolinica (anelli A, B e C), a cui è coniugato un piridone (anello D), e un lattone a sei membri con un gruppo in C₂₀ con configurazione S (anello E). Studi sulla relazione tra struttura ed attività hanno evidenziato che sia l'intera struttura pentaciclica che l'anello E, in forma chiusa lattonica con l'ossidrilico in 20 con configurazione S, sono fondamentali per l'attività della camptotecina e dei suoi derivati [14, 15, 16]. Ciò dimostra che il carbossilato (in forma di sale sodico) della camptotecina, derivante dall'apertura dell'anello ed utilizzato nei primi trials clinici, non era probabilmente un farmaco da impiegare, in quanto inefficace.

In vivo tra la forma lattonica chiusa e quella carbossilata aperta esiste un equilibrio reversibile fortemente influenzato dal pH (il pH acido promuove la formazione del lattone, mentre quello basico favorisce la forma anionica idrossi-acida) e dall'affinità di legame verso le proteine del plasma [17, 18]. Studi biochimici hanno rivelato che più del 99.5% della camptotecina si trova nel plasma umano nella forma di un carbossilato inattivo [19]. Questo spiega perché i

principali sforzi nello sviluppo del farmaco siano stati principalmente focalizzati sull'ottenimento di forme chiuse dell'anello che determinano la solubilità e l'attività del composto. La camptotecina naturale, infatti, di per sé è insolubile in acqua e per questa ragione è stata utilizzata nei primi trials nella forma più idrosolubile di sale carbossilato di sodio [13]. Sfortunatamente questo derivato più polare causava una severa tossicità e sembrava essere privo di attività antitumorale tanto da portare al blocco della sperimentazione clinica di fase II [20, 21]. L'attenzione su questa famiglia di composti fu riaccesa diversi anni dopo grazie alla scoperta dell'esclusivo target intracellulare, la TOPO I [22, 23], e ciò portò a focalizzare gli sforzi sulla sintesi di nuovi derivati ottenuti da opportune modifiche della molecola naturale di camptotecina. Uno dei più importanti risultati di questa attività è rappresentato dal derivato semisintetico 7-etil-10-idrossi-camptotecina (SN-38) [24]. La struttura chimica di tale composto (Figura 1.1.b) evoca la molecola della 10-idrossi camptotecina, con la sola differenza di un gruppo etilico in posizione 7 nell'anello B [25]. Questa modifica ha lo scopo di conferire al derivato SN-38 una straordinaria attività anti-TOPO I ed antitumorale in vivo [26, 27, 28]. Inoltre l'inserimento della catena alchilica in 7 aumenta notevolmente la stabilità dell'anello lattonico in condizioni fisiologiche, prevenendo il legame altamente specifico della forma carbossilata rispetto a quella lattonica all'albumina umana [29]. La strategia di incrementare la solubilità in acqua degli analoghi della camptotecina, incluso l'SN-38, era inizialmente basata sull'introduzione di gruppi polari alchil amino terziari in varie posizioni sugli anelli A e B che meglio tollerano delle modifiche mantenendo l'attività anti-TOPO I [30]. In accordo con questa strategia, l'introduzione del gruppo di-piperazinico, tramite l'esterificazione del carbamato dell'idrossile in 10 nell'anello A dell'SN-38, generò il derivato irinotecano (CPT-11) (Figura 1.1.c), caratterizzato da una solubilità in acqua superiore alle concentrazioni raggiungibili per iniezione intravenosa [31]. Studi su linee cellulari tumorali umane e di topo evidenziarono, tuttavia, che tale composto presentava una potenza approssimativamente 1000 volte minore dell'SN-38 come inibitore della TOPO I [32], mantenendo comunque un buon effetto citotossico in modelli preclinici di tumori murini [31]. E' stato presto dimostrato che questo paradosso sull'attività del CPT-11 è legato alla sua conversione in vivo nell'SN-38 per mezzo di una reazione di idrolisi, mediata dalle carbossilesterasi, del legame carbamato fra metà della camptotecina e la catena laterale di-piperidinica [31]. Questa scoperta ha contribuito ad attribuire all'irinotecano solamente un ruolo di precursore idrosolubile del più potente e lipofilo SN-38, l'inibitore topoisomerasico. Tale meccanismo di attivazione in vivo conferisce al CPT-11 un profilo farmacologico positivo, che assieme all'elevata attività osservata nei primi studi pre-clinici, ne ha accelerato

l'uso in trials clinici. L'irinotecano è stato inizialmente approvato come terapia di seconda linea per tumori colon rettali metastatici refrattari al 5-FU; tuttavia l' elevato potenziale terapeutico esibito da tale farmaco ne ha incoraggiato subito la valutazione clinica in altre patologie neoplastiche quali il tumore della mammella, della cervice e del polmone non a piccole cellule (NSCLC) [33].

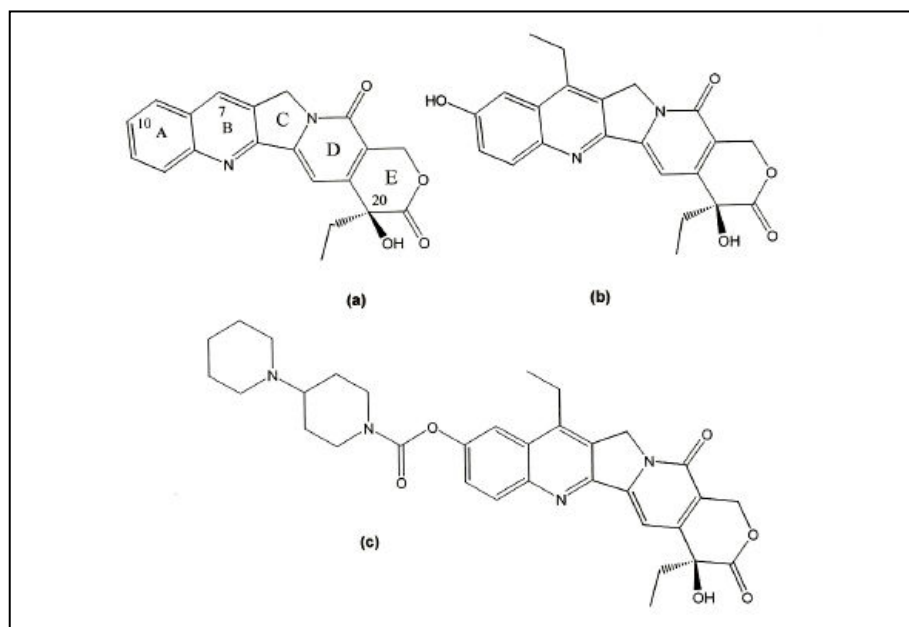


Figura 1.1: Strutture chimiche della camptotecina (a), SN-38, (b) e irinotecano (c).

Meccanismo d'azione

L'irinotecano, o meglio il suo metabolita attivo SN-38, agisce come inibitore della TOPO I, un enzima fondamentale per facilitare la replicazione e trascrizione del DNA permettendone lo srotolamento e rilassamento dei filamenti. In particolare, tale proteina è in grado di disavvolgere la doppia elica superavvolta a livello delle forcelle replicative, liberando il sito di trascrizione attiva [34]. La TOPO I, in primo luogo, lega il DNA sorretto da proteine, formando un complesso non covalente, denominato “non-cleavable complex”, il quale è in equilibrio con il cosiddetto “cleavable complex”. Quest'ultimo si forma quando l'enzima crea una rottura transitoria su un filamento di DNA e allo stesso tempo si lega covalentemente al gruppo fosforico in 3' dell'acido nucleico tramite i gruppi idrossil-fenolici di una Tirosina (Tyr723 della TOPO I umana) [35]. Il filamento di DNA intatto è in grado di disavvolgersi e di attraversare il sito di rottura prima che l'enzima ricongiunga quello tagliato e possa ristabilire la conformazione a doppia elica. Si ritiene che la camptotecina interagisca con il “cleavable complex” DNA–TOPO I, stabilizzando la rottura nel filamento singolo di DNA ed

impedendo il rinsaldo dello stesso, arrestando/ritardando così il movimento della TOPO I lungo il DNA [15, 35]. Sebbene tale tipo di danno al DNA di solito non sia letale per le cellule tumorali, in questo caso le lesioni si convertono in una rottura irreversibile del doppio filamento a causa della collisione fra la DNA polimerasi, che sta avanzando e operando a livello della forcella replicativa, ed il “cleavable complex” DNA-TOPO I stabilizzato dalla camptotecina; ciò inibisce la rilegatura del DNA che ferma la sintesi di acido nucleico e porta ad una cascata di eventi che culminano con la morte cellulare [23]. A causa dell’effetto citotossico primario della camptotecina, risultante da tale processo, i composti di questa famiglia sono considerati agenti specifici per la fase S del ciclo cellulare. Le camptotecine sembrano avere maggiore attività antitumorale e sembrano indurre maggiori danni al DNA se somministrate in modo frequente e ripetitivo [36].

Metabolismo

Il metabolismo dell’irinotecano è un processo particolarmente complesso che coinvolge numerose proteine efficaci sia nell’attivazione del profarmaco in SN-38 sia nelle reazioni che portano alla eliminazione biliare o renale del farmaco e dei suoi metaboliti [37, 38] (Figura 1.2).

Una volta somministrato al paziente, l’irinotecano nel plasma è in equilibrio fra la forma lattonica (attiva) e quella carbossilata (inattiva); a PH fisiologico la forma predominante è quella lattonica e in tale conformazione il profarmaco attraversa le membrane plasmatiche essenzialmente per diffusione passiva. Una volta dentro la cellula, l’irinotecano viene convertito nel suo metabolita attivo SN-38 per mezzo di una reazione di idrolisi catalizzata dalle isoforme 1 e 2 della carbossilesterasi umana (hCES1, hCES2) presenti nel siero, intestino, tessuto tumorale e, ad alte concentrazioni, nel fegato [39, 40, 41]. In particolare studi in vitro hanno dimostrato che l’isoforma hCES2 possiede un’attività maggiore rispetto hCES1 nell’attivazione del CPT-11 [42, 43]. Questi enzimi microsomiali favoriscono la conversione del CPT-11 in SN-38 attraverso l’idrolisi della catena laterale di-piperidinica legata al carbonio in posizione 10. Il meccanismo d’azione delle carbossilesterasi è comune alle altre serine idrolasi [44]: inizialmente la porzione 4-piperidinoestere piperidinica è trasferita sulla serina del sito attivo dell’enzima e contemporaneamente avviene il rilascio di SN-38; in seguito si ha la rigenerazione dell’enzima attraverso l’idrolisi del complesso enzima-carbamato. Questa fase, a livello del fegato umano, si è vista essere particolarmente lenta probabilmente per il fatto che il CPT-11, a causa della sua natura di carbamato, risulta

essere un substrato con poca affinità per questa famiglia di enzimi [40]. In genere le hCES manifestano una maggiore attività catalitica verso la forma lattonica dell'irinotecano e ciò può in parte spiegare la predominanza della forma lattonica attiva anche dell'SN-38 plasmatico di pazienti riceventi il profarmaco [45]. Questa proprietà, assieme alla bassa velocità di attivazione esibita da questo enzima, ha una importante implicazione nell'attività clinica del CPT-11 in quanto contribuisce a realizzare in vivo un lento rilascio del metabolita attivo che costituisce la condizione ottimale per il raggiungimento del miglior effetto citotossico tramite l'inibizione della TOPO I. Infatti i complessi potenzialmente letali delle camptotecine con la TOPO I e il DNA (cleavable complex), diventano reversibili nei minuti successivi alla rimozione del farmaco [28, 46] per cui una sua concentrazione plasmatica costante significa stabilità del complesso per tempi più lunghi [47].

Oltre al processo di attivazione, l'irinotecano, una volta somministrato al paziente, può andare incontro anche ad un metabolismo ossidativo che lo trasforma in diversi derivati non farmacologicamente attivi, fra cui principalmente il 7-etil-10-[4-N-(5 acido aminopentanoico)-1-piperidino]carbonilossi-camptotecina (APC) e il 7-etil-10-(4-amino-1-piperidino)carbonilossicamptotecina (NPC) [37]. Tale step ossidativo è realizzato ad opera delle isoforme 3A4 ed, in minor misura, 3A5 del citocromo P-450 (CYP3A4 e CYP3A5) [48], espresse ad elevati livelli nel fegato umano. In particolare, in pazienti riceventi irinotecano sono stati rilevati diversi metaboliti ossidati sia nel plasma che nella bile ed urine; i due più abbondanti e caratteristici del metabolismo di CPT-11 sono comunque APC e NPC. Queste molecole possono essere prodotte dalla stessa serie di reazioni, con la sola differenza che, per la formazione di NPC, sono necessarie le due ultime successive α -idrossilazioni senza lo step ossidativo. I due metaboliti presentano, dal punto di vista strutturale, una funzione carbossilica ottenuta dall'apertura dell'anello piperidinico distale del CPT-11 in seguito ad una ossidazione del carbonio in posizione 10 (APC) oppure un unico anello piperidinico con una funzione amminica primaria in C₁₀ derivata sempre dall'anello piperidinico distale (NPC) [48, 49, 50, 51]. Sia APC che NPC non presentano una citotossicità rilevante dal punto di vista farmacologico; tuttavia NPC può assumere un ruolo funzionalmente importante in quanto sembra essere substrato per le hCES e portare quindi alla formazione di ulteriori quantitativi di SN38 [49].

Il meccanismo di detossificazione dell'irinotecano prevede la trasformazione di SN-38 nel suo derivato inattivo tramite una reazione di coniugazione con una molecola di acido glucuronico catalizzata da enzimi appartenenti alla famiglia delle uridino-glucuronosiltransferasi 1A (UGT1A) e principalmente dalle isoforme UGT1A1, UGT1A7 e

UGT1A9 ed, in minima parte, dalle isoforme UGT1A6 e UGT1A10, [52, 53, 54, 55], proteine differenzialmente espresse nel fegato e presenti anche in tessuti extraepatici. La glucuronidazione è una reazione metabolica di fase II che, con l'inserimento di una molecola di acido glucuronico, conferisce polarità ai substrati xenobiotici ed endogeni facilitandone l'eliminazione dal corpo. In particolare tale reazione prevede il trasferimento di una porzione del co-substrato uridin difosfato-acido glucuronico sull'O-arilidrossi in C-10 dell'SN-38. Questo step metabolico non solo inattiva il farmaco ma è utile nella trasformazione dell'SN-38 in un metabolita più solubile in acqua e quindi meglio escreto attraverso le urine e la bile. L'SN-38G è la forma predominante di SN-38 *in vivo* sia a livello plasmatico che urinario, mentre è poco presente nelle feci, sebbene il tratto biliare sia riconosciuto come importante via di rimozione [37, 56]. Ciò può essere spiegato dal fatto che le β -glucuronidasi batteriche presenti nel lume intestinale possono idrolizzare la forma inattiva SN-38G e rigenerare quindi l'SN-38 [37]. Quest'ultimo, grazie anche al ricircolo enteroepatico, viene reso nuovamente disponibile ed è responsabile degli effetti tossici tardivi dell'irinotecano come danni tissutali e diarrea (per dettagli vedi la sezione relativa alla tossicità). Dato che i batteri con attività β -glucuronidasica possono essere eliminati da diversi medicinali, come ad esempio gli antibiotici, è stato dimostrato che l'utilizzo di questi farmaci porta ad una significativa variazione nella concentrazioni plasmatiche di CPT-11, SN-38 o SN38-G con un effetto anche sulle manifestazioni avverse legate all'impiego di irinotecano [57, 58].

Infine l'escrezione dalla cellula di CPT-11, di SN-38 e del suo glucoronide SN-38-G, è determinata dall'azione coordinata di trasportatori di membrana appartenenti alla famiglia dell'OATP, in particolare OATP1B1, e alla famiglia dell'ABC proteins, tra cui soprattutto MDR1, MRP1, MRP2 e BCRP. In particolare, dai dati sperimentali fin'ora ottenuti, OATP1B1 sembra essere responsabile soprattutto dell'uptake di SN-38 dal plasma verso gli epatociti, mentre l'eliminazione di CPT-11 e dei suoi metaboliti nella bile sembra essere mediata dall'attività coordinata di MDR1, MRP2 e BCRP; MRP1 è invece probabilmente coinvolto nell'efflusso di SN-38 dagli epatociti verso lo spazio interstiziale [59]. Ognuno di questi trasportatori presenta una propria caratteristica specificità di substrato e localizzazione cellulare e tissutale che verrà dettagliatamente trattata in una sezione successiva di questa Introduzione.

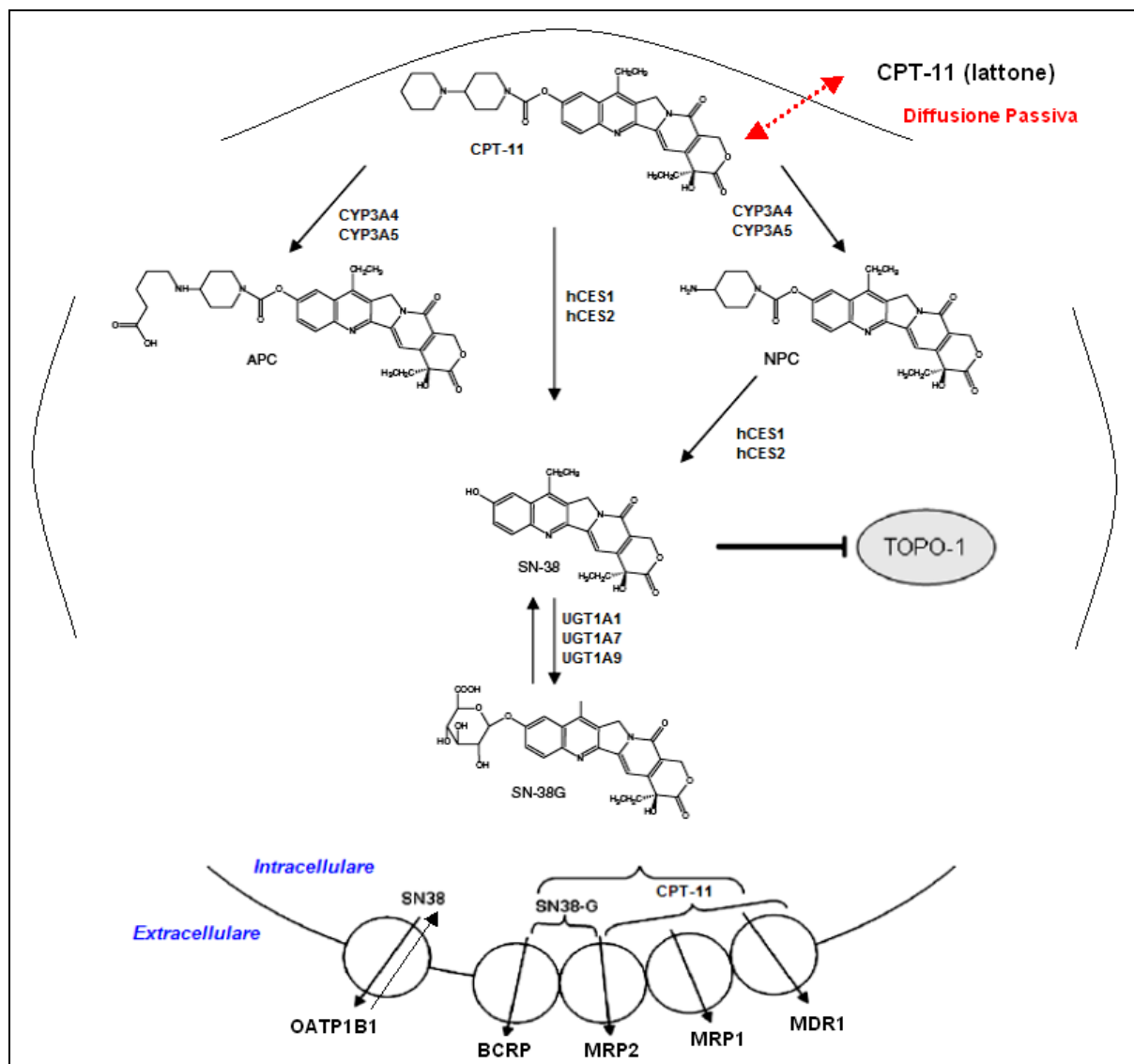


Figura 1.2: Vie metaboliche del CPT-11: formazione mediata dalla carbossilesterasi umana (hCES1, hCES2) del metabolita attivo SN-38 e sua conseguente conversione nel derivato glucuronato (SN-38G) catalizzata dalle isoforme 1A1, 1A7 e 1A9 dell'UGT, associata alla deglucuronazione promossa dalle glucuronidasi intestinali. Il CPT-11 può anche essere coinvolto nel metabolismo ossidativo mediato dal citocromo P450 (CYP3A4, CYP3A5) con formazione delle specie APC e NPC, quest'ultima può a sua volta essere idrolizzata dalla carbossilesterasi con rilascio di SN-38. Il flusso di entrata/uscita dalla cellula di CPT-11, SN-38 e SN-38G è mediato dall'azione coordinata di una serie di trasportatori di membrana (MDR1, MRP1, MRP2, BCRP, OATP1B1). Vedere il testo per i dettagli.

Farmacocinetica

Gli aspetti farmacocinetici dell'irinotecano, quali assorbimento, distribuzione ed eliminazione, sono stati ampiamente studiati e caratterizzati [37, 38].

Dopo somministrazione per infusione intravena il CPT-11 e l'SN-38 sono misurabili a livello plasmatico sia nella forma lattonica chiusa che in quella carbossilata aperta. Le forme lattoniche di CPT-11 e SN-38 sono trasportate principalmente tramite diffusione passiva, mentre le forma carbossilate vengono assorbite con un meccanismo di trasporto attivo. Entrambi i composti sono trasportati in maniera più significativa sotto forma di lattoni ed il grado di uptake mostra una chiara dipendenza dal pH, diminuendo del 68% quando il valore di pH supera il 6.8; una riduzione dell'uptake di SN-38 sembra anche correlare con un minore citotossicità del composto [60].

Per quanto riguarda la distribuzione, comparato con le altre camptotecine, l'SN38 è mantenuto nel plasma in proporzioni maggiori sottoforma di lattone attivo [37]. Questo fenomeno può essere relazionato con la stabilizzazione della forma lattonica data dal legame con l'albumina umana [37]. Nella maggioranza degli studi condotti sulla farmacocinetica dell'irinotecano, il picco plasmatico di concentrazione e l'AUC (area sottesa alla curva concentrazione/tempo) del CPT-11 aumentano in modo proporzionale con la dose somministrata, seguendo una farmacocinetica di tipo lineare [37]; ciò implica inoltre che la dose somministrata ed il regime impiegato non influenzano la clearance totale plasmatica ($13.5 \pm 3.5 \text{ L/h/m}^2$) né il volume di distribuzione particolarmente ampio (157 l/m^2) [37, 38]. Simili caratteristiche sono state riportate anche per il metabolita SN-38 [37, 38]. Sia la forma aperta che quella chiusa del CPT-11 e dell'SN-38 sono rilevabili nel plasma subito dopo l'infusione intravenosa del farmaco. Comunque l'AUC dell'SN38 è circa il 2-4% di quella del suo precursore, suggerendo che solo una piccola parte del farmaco viene convertita nel metabolita attivo [38].

Il tempo di emivita ($t_{1/2}$) dell'irinotecano (in media dalle 9.3 alle 14.2 ore), così come quello della forma lattonica dell'SN38 (in media dalle 13.0 alle 13.8 ore), è molto elevato soprattutto se paragonato ad altri farmaci simili come il topotecano [37, 38].

L'eliminazione dell'irinotecano avviene principalmente tramite escrezione biliare [61]; mentre l'eliminazione urinaria del composto risulta essere solo il 10-22% della dose somministrata [37]. Anche l'SN38, in seguito a glucuronidazione, viene escreto principalmente per via biliare e solo lo 0.18-0.43% del metabolita attivo viene rilasciato dai reni [37]. La forma glucuronata SN-38G, rappresenta tuttavia il metabolita dell'irinotecano più presente nel plasma e nelle urine [56] mentre nelle feci è presente in minor misura [61]; ciò può essere dovuto all'attività delle β -glucuronidasi batteriche, presenti a livello enterico, che possono rigenerare il metabolita attivo SN-38 nel lume intestinale e rimetterlo poi in circolo [37].

Impiego clinico e tossicologia

L'irinotecano è un farmaco largamente impiegato, da solo o in regimi di associazione con altri chemioterapici, per il trattamento di varie forme tumorali, tra cui principalmente il CCR metastatico.

In particolare, per quanto riguarda il CCR, la FDA nel 1996 approvò l'impiego del CPT-11 per il trattamento di pazienti con CCR che recidivavano o andavano incontro a progressione dopo terapia con 5-fluorouracile (5-FU). In seguito, nel 2000, l'irinotecano, in associazione con 5-FU e leucovorina (LV), fu approvato come terapia di prima linea del CCR metastatico [62] e rappresenta oggi una delle opzioni standard per il trattamento di questa neoplasia. L'impiego del CPT-11 è stato valutato anche nella terapia adiuvante del CCR generando però risultati non altrettanto positivi [63]. Dati promettenti sono stati invece ottenuti dall'utilizzo di questo chemioterapico per il trattamento di altre neoplasie quali ad esempio il carcinoma polmonare sia a piccole cellule che non (NSCLC e SCLC), il tumore mammario, ovarico e della cervice e varie neoplasie gastrointestinali e cerebrali [62].

Diversi studi hanno evidenziato delle interazioni farmacologiche significative fra l'irinotecano e altri agenti terapeutici che vanno a modulare positivamente o negativamente l'attività delle proteine coinvolte nel processo metabolico del CPT-11. Tali interazioni possono influenzare la farmacodinamica e farmacocinetica dei farmaci coinvolti con importanti risvolti clinici. Particolare attenzione deve essere posta specificatamente quando si somministra l'irinotecano insieme a induttori o inibitori dei citocromi, del sistema UGT e delle proteine coinvolte nel trasporto di CPT-11 e dei suoi metaboliti. Si è osservata, ad esempio, un'importante riduzione dell'esposizione a CPT-11 e SN-38 in pazienti che ricevono assieme all'irinotecano agenti induttori dell'isoforma CYP3A4 come ad esempio alcuni anticonvulsivanti (fenitoina, fenobarbital, carbamazepina) e antibiotici (rifampin, rifabutin) [37, 64]; interazioni come queste sono di cruciale importanza in quanto possono portare ad una significativa diminuzione dell'efficacia antitumorale del chemioterapico. Uno scenario opposto, con un aumento dell'esposizione a CPT-11 ed SN-38, si è evidenziato, invece, in pazienti trattati con ketoconazolo o con il meno comune troleandomicina, farmaci che sono forti inibitori del citocromo CYP3A4 [37]. Un'alterazione del processo di glucuronazione ed inattivazione di SN-38 si è evidenziata, invece, somministrando prima dell'irinotecano l'anticonvulsivante acido valproico, un inibitore del sistema UGT che porta ad una minore detossificazione del farmaco e quindi ad un aumento dell'esposizione al metabolita attivo, ed il fenobarbitale che,

al contrario, potenzia la capacità di glucuronazione riducendo quindi la biodisponibilità dell'irinotecano e di SN-38 [65].

Infine, l'impiego dell'irinotecano con la ciclosporina A [66, 67, 68], un immunosoppressore in grado di bloccare vari sistemi di trasporto dell'irinotecano e dei suoi metaboliti, si è visto portare ad una diminuzione dell'escrezione di SN-38 a livello della bile con conseguente riduzione dell'incidenza della diarrea; al contempo si è evidenziato però anche un aumento delle concentrazioni plasmatiche del metabolita attivo con possibile potenziamento della tossicità midollare.

Nei casi in cui si deve impiegare assieme all'irinotecano uno dei farmaci sopracitati è necessario, quindi, modulare opportunamente la dose del chemioterapico, adeguandola all'alterazione metabolica indotta dalla terapia concomitante, oppure scegliere un farmaco alternativo, ove possibile, che non abbia un'azione inducente o inibente su proteine importanti per il meccanismo biologico del CPT-11. In altri casi, come il ketoconazolo, il trattamento deve invece essere proprio interrotto settimane prima dell'inizio della chemioterapia.

Potenziamenti interazioni farmacologiche con l'irinotecano derivano anche dal suo impiego in associazione con altri chemioterapici [37]. Ad esempio dati preclinici indicano un aumento della clearance del CPT11 quando viene somministrato insieme con il carboplatino [37] la cui farmacocinetica non sembra invece essere influenzata dalla combinazione; ciò è probabilmente dovuto ad un effetto del derivato del platino sull'espressione del citocromo CYP3A4. Altre possibili interazioni con l'irinotecano sono state suggerite per il docetaxel e il paclitaxel; tali interazioni sembrano essere tuttavia facilmente controllabili modificando opportunamente lo schema di somministrazione. L'utilizzo del CPT-11 assieme a 5-FU e leucovorina, nella maggior parte degli studi, non sembra invece portare ad alcuna alterazione farmacodinamica o farmacocinetica clinicamente rilevante [37].

Nonostante la sua efficacia antitumorale, l'irinotecano è un farmaco che presenta degli effetti tossici particolarmente significativi che ne rendono spesso complicato l'impiego nella pratica clinica. In particolare le tossicità più severe e dose-limitanti, riscontrate durante la terapia con irinotecano, sono la neutropenia e la diarrea tardiva [69, 70]. La neutropenia rappresenta la principale tossicità di tipo ematologico ed è di carattere reversibile e non cumulativa. La forma febbrile, sempre reversibile e non cumulativa, si presenta solo in una minoranza dei casi (3-6%) [69, 71] ed è tempestivamente curata con terapia antibiotica in modo da evitare sepsi letali. In caso di severa neutropenia può essere facoltivamente impiegato un supporto con fattori-stimolanti colonia (CSF). Altre reazioni avverse legate alla mielosoppressione indotta dal farmaco, frequenti ma generalmente di grado meno severo, sono la leucopenia,

l'anemia e più raramente la trombocitopenia. Questa importante mielosoppressione legata all'irinotecano si pensa sia dovuta all'effetto citotossico del metabolita attivo SN-38 sulle cellule del midollo osseo; bisogna inoltre evidenziare che l'SN-38 nel plasma, oltre che all'albumina, è particolarmente legato ai linfociti, agli eritrociti e ai neutrofilo su cui può esercitare quindi un'azione tossica [37]. La diarrea tardiva rappresenta, invece, la più frequente (40% dei casi trattati) e la più importante tossicità di tipo non ematologico [69]; essa compare dopo 24 ore dalla somministrazione di irinotecano e se prolungata nel tempo e non tempestivamente trattata può portare alla morte del paziente per disidratazione, sbilancio elettrolitico e sepsi. Proprio per evitare queste conseguenze negative si effettua generalmente una profilassi con un antidiarroico, come il loperamide, oppure con un antibiotico, la neomicina, che agisce riducendo la produzione di β -glucuronidasi da parte della flora batterica. Infatti, si presuppone che questa forma severa di diarrea tardiva sia associata ad un aumento della concentrazione del metabolita attivo SN-38 a livello della mucosa intestinale [56, 72]; tale incremento locale può essere dovuto: 1) alla conversione in SN-38 di CPT-11 e del metabolita NPC, escreti attraverso le vie epatobiliari, per mezzo delle hCES intestinali; 2) alla riconversione nella forma attiva di SN-38G, proveniente dalla bile o dall'attività dell'enzima UGT1A7 intestinale, da parte delle β -glucuronidasi batteriche endogene; 3) all'escrezione epatobiliare direttamente di SN-38 [72, 73]. Dato che i batteri con attività β -glucuronidasica possono essere eliminati dagli antibiotici, è stato dimostrato come l'utilizzo di questi farmaci possa portare ad una riduzione dell'effetto acuto della diarrea tardiva e dei danni al ceco [58]. Alcuni studi hanno inoltre evidenziato che la terapia antibiotica mentre a livello intestinale induce una diminuzione delle concentrazioni del metabolita attivo SN-38 ed un concomitante aumento della forma glucuronata, a livello plasmatico non porta ad alcuna modifica dei livelli di CPT-11, SN3-8 o SN38-G [74, 75]. Ulteriori effetti tossici dovuti al danno provocato dal metabolita attivo a livello della mucosa intestinale sono la nausea ed il vomito, sintomatologie che appaiono durante o immediatamente dopo l'inizio della somministrazione del farmaco e che risultano di intensità relativamente severa. Altri frequenti effetti collaterali dell'irinotecano, caratteristici dei primi momenti dopo l'infusione del farmaco, sono legati alla cosiddetta "sindrome colinergica acuta" dovuta dall'inibizione non competitiva dell'enzima acetilcolinesterasi da parte di CPT-11 e forse del suo metabolita APC, che porta ad una liberazione ed aumento di sostanze ad azione colinergica o comunque vasoattiva [37, 40]. Tali reazioni avverse sono rappresentate ad esempio da diarrea precoce, incremento della sudorazione e salivazione, dolori addominali crampiformi, disturbi visivi,

lacrimazione, miosi, rinite, ipotensione e bradicardia [69]. In particolare la diarrea di forma acuta, transiente raramente severa e non dose limitante, si distingue da quella tardiva, oltre che per il meccanismo causativo, anche per i tempi d'insorgenza presentandosi durante o immediatamente dopo l'infusione del farmaco [69]. Tutti questi sintomi colinergici possono essere prevenuti o attenuati tramite pretrattamento del paziente con atropina, un forte anticolinergico [69]. Infine altri frequenti effetti tossici osservati durante terapia con irinotecano sono una modica astenia, alopecia e anoressia [40, 69].

Tutte queste manifestazioni avverse legate alla terapia con irinotecano sono caratterizzate da una significativa variabilità interindividuale sia per quanto riguarda la possibile insorgenza che il grado di severità.

Tale variabilità inter-soggettiva è stata, in alcuni casi, associata a differenti livelli plasmatici del metabolita attivo SN-38 [37] e, ad ogni modo, si è visto essere il risultato di interrelazioni complesse fra molteplici vie metaboliche la cui attività è a sua volta influenzata da vari fattori fra cui anche le differenze genetiche delle proteine in esse coinvolte. Promettenti possibilità di personalizzare ed ottimizzare la terapia con irinotecano, diminuendo le reazioni avverse al farmaco ed incrementando al contempo l'efficacia clinica dello stesso, si sono evidenziate negli ultimi grazie l'impiego di marker genici predittivi [59, 76, 77].

1.3 L'IRINOTECANO NEL TRATTAMENTO DEL CARCINOMA COLONRETTALE METASTATICO

Il CCR è uno delle principali cause di decesso per tumore nel mondo occidentale e la maggior parte dei pazienti muore durante la fase metastatica della malattia [78, 79]. Tale neoplasia presenta una eziologia multifattoriale in cui fattori ambientali, dietetici e genetici concorrono insieme allo sviluppo della malattia. La maggior parte dei carcinomi colonrettali, indipendentemente dall'eziologia, deriva da polipi adenomatosi e la prognosi del paziente dipende strettamente dal grado di penetrazione della neoplasia nella parete intestinale, dall'interessamento o meno dei linfonodi regionali e dalla presenza di metastasi a distanza [79]. Il trattamento per la cura del tumore al colon comprende l'asportazione chirurgica, la radioterapia e la chemioterapia. Per molti anni il farmaco più utilizzato nella chemioterapia del carcinoma al colon è stato il 5-FU che, in trattamento monoterapico, presentava, però, una percentuale di risposta molto bassa. Si è cercato, quindi, di sviluppare nuovi farmaci che potessero essere utilizzati sia da soli che in combinazione con il 5-FU in modo da potenziarne gli effetti. Oggi per la cura del tumore del colonretto in fase avanzata vengono utilizzati oltre al 5-FU, assieme di solito all'acido folico (LV) come modulatore biochimico, anche l'irinotecano e l'oxaliplatino, sia in monoterapia che in associazione con il 5-FU/LV. Evidenze sperimentali suggeriscono inoltre la possibilità di sostituire il 5-FU con una fluoropirimidina a somministrazione orale come ad esempio la capecitabine (Xeloda®) [78, 79]. In particolare, per quanto riguarda l'irinotecano, un approccio comune al trattamento sistemico del CCR metastatico, è la combinazione di CPT-11 con il 5-FU e LV. Due sono i regimi di combinazione che sono stati approvati e che sono oggi largamente in uso per il CCR avanzato: IFL (irinotecano, 5-FU e LV), un protocollo in uso negli Stati Uniti nel quale viene somministrato 5-FU in bolo [80], e l'europeo FOLFIRI che prevede 5-FU in infusione continua [81]. Gli studi che hanno indicato questi due regimi, dimostrano in termini di risposta e sopravvivenza la superiorità della combinazione di irinotecano con 5-FU/LV in confronto a 5-FU, LV o irinotecano da soli [80, 81]. I regimi che prevedono l'infusione continua di 5-FU sono inoltre più efficaci e meno tossici di quelli che prevedono la somministrazione di 5-FU in bolo [82] e il FOLFIRI [81] è meno tossico di IFL [80]. Evidenze cliniche supportano infine l'associazione di regimi chemioterapici contenenti CPT-11 con agenti biologici di recente sviluppo come il bevacizumab (Avastin®), un anticorpo monoclonale umanizzato anti-VEGF (vascular endothelial growth factor), e il cetuximab (Erbix®), un anticorpo monoclonale chimerico uomo-topo anti-EGFR, (epidermal growth factor receptor) [83, 84].

1.4 FARMACOGENETICA DELL'IRINOTECANO

L'attività dell'irinotecano può essere fortemente influenzata da variazioni genetiche che vanno ad alterare l'attività o il livello d'espressione delle proteine che intervengono nei complessi meccanismi biochimici in cui è coinvolto tale chemioterapico. Questi polimorfismi genici possono modulare il potere citotossico del farmaco sia sulle cellule dell'ospite che del tumore, determinando così, infine, l'esito del trattamento sia in termini di tossicità che di efficacia. In particolare, dai dati di letteratura emerge che le vie metaboliche, e le relative proteine, più importanti nel determinare l'attività dell'irinotecano sono:

- il processo di attivazione (hCES1, hCES2)
- il metabolismo ossidativo (CYP3A4, CYP3A5)
- il processo di inattivazione e detossificazione (UGT1A1, UGT1A7, UGT1A9)
- l'escrezione e l'uptake del farmaco e dei suoi metaboliti (OATP1B1, MDR1, MRP1, MRP2, BCRP).

Nel lavoro di farmacogenetica di questa tesi sono stati considerati ed analizzati, in particolare, lo step ossidativo, il processo di glucuronazione ed inattivazione e le molteplici vie di trasporto del farmaco. Ciascuna delle proteine enzimatiche e trasportatrici coinvolte è caratterizzata da polimorfismi genici noti che ne possono alterare significativamente il livello di espressione e/o la funzionalità. Grazie ad uno screening della letteratura scientifica, tramite processo di revisione MEDLINE, e all'impiego di strumenti bioinformatici si è individuato un set di 50 markers genici da introdurre nel lavoro di questa tesi. I criteri di scelta dei polimorfismi sono stati essenzialmente tre: 1) un dimostrato impatto sul fenotipo della proteina, 2) una prevalenza relativamente discreta nella popolazione caucasica ed, infine, ove presente, 3) un possibile coinvolgimento nel modulare l'effetto farmacologico dell'irinotecano. Altre molecole presenti nel complesso pathway metabolico del CPT-11, quali ad esempio hCES1, hCES2 [85, 86, 87, 88, 89] e la TOPO I [90, 91, 92], non sono state inserite nell'analisi in quanto i dati bibliografici suggeriscono che nel modulare l'outcome della terapia con irinotecano siano più importanti i livelli di espressione e il grado di attività di queste proteine piuttosto che specifici polimorfismi genici, per di più poco diffusi nella popolazione caucasica. Molecole appartenenti ad altri processi biologici non direttamente correlati all'attività dell'irinotecano, quali ad esempio le vie di controllo del ciclo e morte cellulare, i sistemi di riparo del DNA, il sistema di detossificazione del GST ed il controllo del pathway angiogenetico, non sono stati introdotti nell'analisi in quanto ad oggi in letteratura esistono solo pochi e sparsi dati preliminari [77, 93, 94, 95].

Nelle sezioni successive, relativamente ai tre step metabolici considerati, verrà riportata una descrizione dei polimorfismi genici introdotti nel lavoro di tesi. L'impiego di banche date on-line, quali NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>), "SNP500Cancer" (Single Nucleotide Polymorphisms database, <http://variantgps.nci.nih.gov/cgfseq/pages/snp500.do>), "Pharmgkb" (The Pharmacogenomics Knowledge Base, <http://www.pharmgkb.org/>) e "SNPper" (CHIP Bioinformatic Tools, <http://snpper.chip.org/>), e la consultazione del catalogo scientifico Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) ha permesso, oltre alla scelta dei determinanti genici da investigare, la raccolta delle varie informazioni (tipologia e localizzazione genica, frequenza nella popolazione caucasica, effetto fenotipico, impatto sulla terapia con irinotecano) ad essi relativi.

1.4.1 . METABOLISMO OSSIDATIVO (CYP3A4, CYP3A5)

Ad oggi, sono stati identificati oltre cinquanta tipi di citocromi P450 codificati dal genoma umano; l'omologia di sequenza ne ha permesso la classificazione in famiglie (1-14), sottofamiglie (A-E) e tipi (es.1).

La sottofamiglia CYP3A [96] è la tipologia di citocromi più rappresentata nel fegato umano e nel piccolo intestino. Oltre a possedere un ruolo dicotomico nella carcinogenesi chimica, andando a catalizzare sia l'attivazione che la detossificazione ossidativa di molecole protossiche e procarcinogeniche, questa famiglia di enzimi è coinvolta nel metabolismo di fase I di circa il 45-60% di tutti i farmaci, compresi diversi chemioterapici fra cui l'irinotecano, assumendo, quindi, un ruolo fondamentale nella farmacodinamica e farmacocinetica di tali composti. Di questa sottofamiglia 4 isoenzimi presentano una specificità di substrato molto simile e sono: CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 e CYP3A43. Nel processo ossidativo di CPT-11 sono coinvolte specificatamente le isoforme CYP3A4 e CYP3A5 [48]. Il CYP3A4 è il citocromo più espresso nel fegato (comprende circa il 30% del totale contenuto di P450 epatico) e rappresenta anche l'isoforma più abbondante nel tratto gastro-intestinale. CYP3A5 è considerata la seconda più importante isoforma del fegato sebbene la sua espressione sia largamente variabile inter-individualmente [96]. CYP3A4 e CYP3A5 esibiscono entrambi un'ampia variabilità inter-soggettiva sia in termini di espressione che di attività epatica ed intestinale che può riflettersi in una alterazione della biodisponibilità di irinotecano. Le basi biochimiche di tali differenze non sono, al momento, ancora ben chiare, ma è ipotizzabile che varianti geniche di questi enzimi abbiano un ruolo

importante. Per CYP3A4 e CYP3A5 sono stati fin'ora descritti diversi polimorfismi (<http://www.cypalleles.ki.se/>) la maggior parte dei quali presenta, però, una frequenza allelica piuttosto bassa (<1%) tanto da renderli improbabili candidati per uno screening farmacogenetico. Unica eccezione è costituita dalle due varianti geniche introdotte nell'analisi di questa tesi, **CYP3A4*1B** (-392A>G) e **CYP3A5*3** (6986G>A), le cui caratteristiche genotipiche e funzionali, assieme ad eventuali commenti, sono riportate in Tabella 1.2. Diverse evidenze sperimentali, relative soprattutto all'isoforma CYP3A4, dimostrano che il grado di funzionalità dell'enzima, testato tramite un probe specifico (es. midazolam), correla in maniera altamente significativa con parametri farmacocinetici e farmacodinamici di terapia con l'irinotecano [88, 97, 98]. Riguardo ai polimorfismi genici dei due citocromi, alterando i livelli di espressione dell'enzima, è ipotizzabile possano influenzare il grado di conversione di CPT-11 nei suoi metaboliti ossidativi, modificando così la quantità di farmaco disponibile per l'attivazione ad SN-38. A conferma di questo esistono però attualmente solo pochi dati preliminari [99]; è probabile che nell'influenzare il fenotipo di questi citocromi entrino in gioco altri fattori, come ad esempio aspetti epigenetici, che hanno un impatto più importante rispetto all'effetto dei polimorfismi genici la cui rilevanza clinica viene, quindi, diminuita. Infine è importante ricordare che sia CYP3A4 che CYP3A5 sono altamente suscettibili alla inibizione e/o induzione da parte di molteplici sostanze chimiche, fra cui anche diversi agenti terapeutici, la cui somministrazione in concomitanza con irinotecano deve essere, quindi, attentamente controllata (per ulteriori dettagli vedi la sezione relativa alle interazioni farmacologiche). Tale modulazione dell'attività dei citocromi è da considerare anche quanto si va a valutare la rilevanza farmacogenetica delle relative varianti geniche.

Tabella 1.2: Caratteristiche dei polimorfismi di CYP3A4 e CYP3A5 inseriti nell'analisi farmacogenetica: tipologia e localizzazione, frequenza dell'allele variante nella popolazione caucasica, effetto fenotipico e ruolo in relazione alla terapia con irinotecano.

GENE e POLIMORFISMO (rs ID)	TIPOLOGIA e LOCALIZZAZIONE	FREQUENZA nei CAUCASICI dell'ALLELE VARIANTE (%)**	EFFECTO FENOTIPICO	RILEVANZA CLINICA correlata a terapia con IRINOTECANO
CYP3A4 -392A>G or *1B (rs2740574)	Regione al 5'	G : 2.3 - 3.3	Associato <i>in vitro</i> ad un lieve > livello di espressione della proteina e dell'efficienza del metabolismo ossidativo ad essa relativo [100]. Dato non del tutto confermato lasciando ancora poco chiaro l'esatto effetto del polimorfismo.	----- nessun dato -----
CYP3A5 6986A>G § or *3 (rs776746)	Introne 3	G : 87.9 – 96.8	Associato ad un splicing aberrante del mRNA con formazione di una proteina troncata (<i>vedi didascalia per dettagli</i>) ^^ [101]	• Evidenziato un impatto sulla risposta tumorale : [GG < Response Rate (RR) rispetto GA+AA] [99]

** Le frequenze alleliche sono state ricavate da NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>) SNP500Cancer (<http://variantps.nci.nih.gov/cqfseq/pages/snp500.do>) PharmGkb (<http://www.pharmgkb.org/>).

§ **CYP3A5*1** contiene l'allele **A**, più raro nella popolazione caucasica e più frequente invece in quella africana; la forma polimorfica **CYP3A5*3** contiene l'allele **G**, più presente nella popolazione caucasica che in quella africana.

^^ In particolare, l'assenza del polimorfismo (variante CYP3A5*1) in almeno uno dei due alleli portati dal paziente, si riflette in un drammatico incremento del livello di espressione del citocromo CYP3A5, che lo porta a rappresentare il 50% del contenuto totale di enzimi epatici della sottofamiglia CYP3A. La variabilità inter-etnica nella prevalenza di tale polimorfismo può essere associata, quindi, a differenze nel grado di espressione di questa isoforma in diversi gruppi etnici [101].

1.4.2 . ELIMINAZIONE E DETOSSIFICAZIONE (UGT1A1, UGT1A7, UGT1A9)

Gli UGT [102, 103, 104] sono enzimi di fase II, ancorati alla membrana del reticolo endoplasmatico con il dominio catalitico affacciato sulla parte luminare (Figura 1.3.b). Le proteine UGT sono differentemente espresse nel fegato, ma sono presenti anche in altri diversi tessuti extraepatici. La struttura altamente conservata di questi enzimi, assieme alla differente espressione tissutale e alla sovrapposta specificità di substrato, indica per queste proteine un ruolo critico nella detossificazione ed eliminazione di xeno ed endobiotici lipofili dal corpo.

La nomenclatura dei membri della famiglia UGT si basa sull'omologia di sequenza dei geni delle varie isoforme, per cui la superfamiglia è divisa in 2 sotto-famiglie: UGT1 e UGT2. Ogni gene (es. UGT1A1) ha come radice UGT (che denota la superfamiglia dell'enzima espresso), seguita da un numero arabo (rappresentante la famiglia, ad es. "1"), una lettera (che denota la sottofamiglia, ad es. "A") e un altro numero arabo (per il gene individuale, ad es. "1"). Le varianti geniche sono rappresentate da numeri arabi preceduti da un asterisco, in cui l'allele "*1" costituisce la sequenza di riferimento o wild type.

Nel lavoro di questa tesi si è considerata specificatamente la sottofamiglia UGT1A. Il gene umano UGT1, localizzato nel cromosoma 2 e lungo 200 kb, consiste di quattro esoni comuni e almeno tredici esoni variabili. UGT1 codifica per nove isoforme funzionali UGT1A1 e UGT1A3→10 e quattro pseudogeni UGT1A2, UGT1A11, UGT1A12, UGT1A13. L'organizzazione del locus 1A è rappresentata nella Figura 1.4. Questo locus contiene 13 esoni isoforma-specifici all'estremità 5' e 4 esoni all'estremità 3' che sono comuni per ogni UGT1A. La regione fiancheggiante l'estremo 5' di ogni primo esone contiene elementi promotori per l'inizio della trascrizione, mentre vicino al 3' ci sono i siti di splicing. L'azione coordinata di entrambi questi elementi regolatori direziona la sintesi del trascritto del RNA che, infine, contiene un primo esone individuale, unito poi agli esoni comuni 2-5. In particolare, i 280 aminoacidi del residuo ammino-terminale della proteina UGT1A, trascritti dall'unico esone 1, danno all'isoforma la specificità di interazione con il substrato; i 245 aminoacidi della porzione carbossi-terminale, codificati dagli esoni 2-5, sono invece coinvolti nell'interazione con UDP-glucuronato e sono gli stessi per tutte le isoforme dell'UGT1A. (Figura 1.4.a). Per cui, dallo splicing alternativo, si possono ottenere RNA con differenti estremi 5' ma la stessa coda 3'. Infine, le sequenze pseudogeniche di questo locus non sono trascritte e stanno ad indicare pregresse mutazioni (quali eventi di duplicazioni, conversione e delezione).

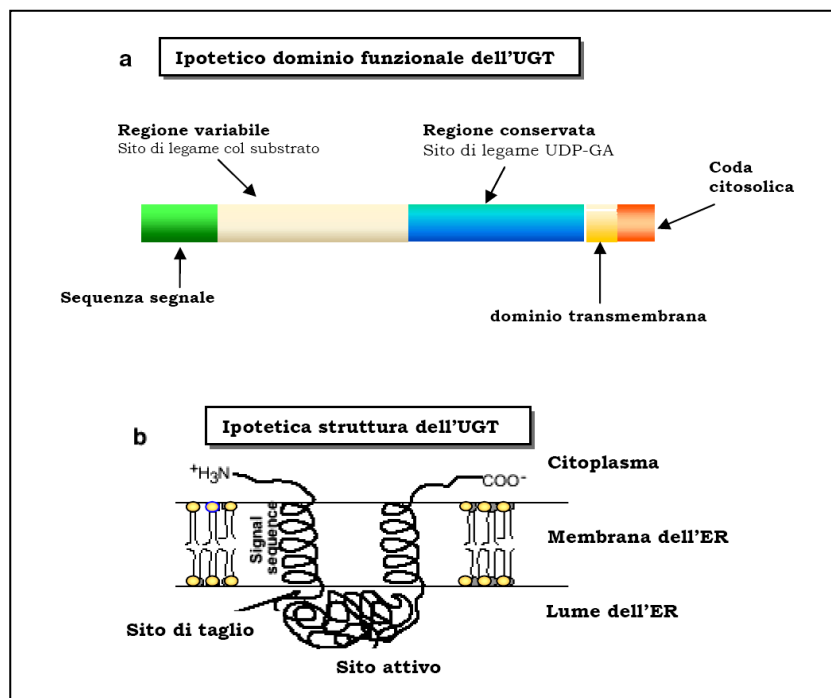


Figura 1.3: Struttura putativa delle proteine UGT. (a) I domini funzionali sono rappresentati su una proteina linearizzata. **(b)** La proteina UGT è raffigurata nella localizzazione presunta all'interno della membrana endoplasmatica. (ER, reticolo endoplasmatico) [102]

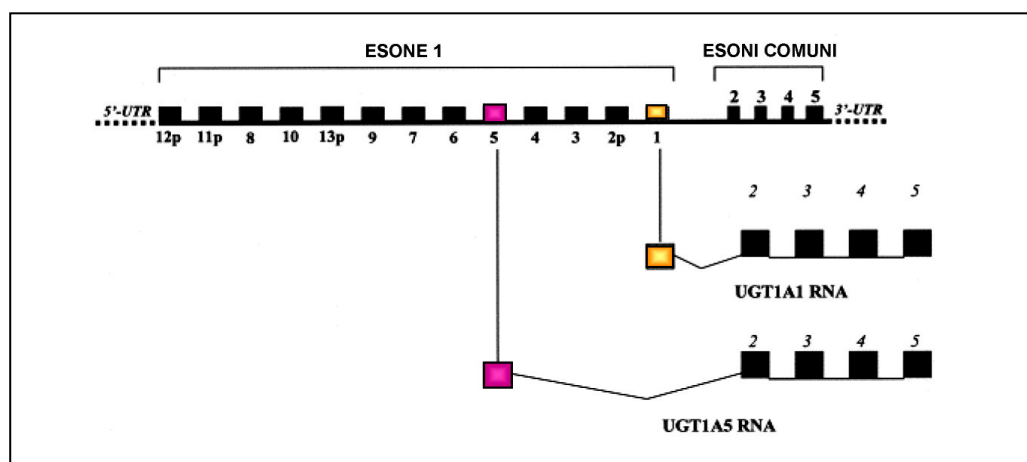


Figura 1.4: Struttura del locus relativo alle isoforme 1A dell'UGT; ciascuna isoforma consiste in 1 esone isoforma specifico (12p – 1) e in 4 esoni comuni (2-5). Negli esoni 1 c'è il sito per lo splicing alternativo in RNA (come mostrato in questo esempio per le isoforme 1A1 e 1A5). Ad eccezione dei pseudogeni 2p, 11p, 12p e 13p, tutti gli esoni hanno i loro promotori; la parte prossimale di questi promotori contiene il TATA box che è importante per la trascrizione.

La superfamiglia di enzimi UGT1A [102, 103, 104] catalizza la reazione di glucuronazione, che è una delle più importanti vie di detossificazione ed eliminazione, sia di substrati endogeni, quali steroidi ed acidi biliari, che di numerosi xenobiotici fra cui molecole cancerogene ed agenti farmacologicamente rilevanti come l'irinotecano. In particolare nel processo di glucuronazione di CPT-11 sono coinvolte soprattutto le isoforme UGT1A1, UGT1A7 e UGT1A9. Ad oggi, per queste proteine, sono stati descritti diversi polimorfismi genici che, modificando significativamente la funzionalità dell'enzima, possono alterare la glucuronidazione dell'irinotecano con conseguente impatto su aspetti farmacocinetici e farmacodinamici dello stesso farmaco. Le varianti geniche introdotte nel lavoro di tesi sono riportate in Tabella 1.3 dove sono schematizzate le principali caratteristiche e dove sono riassunte le evidenze bibliografiche che indicano un loro possibile coinvolgimento nel modulare la terapia con irinotecano. In particolare si tratta di studi clinici condotti principalmente su pazienti con CCR, di etnia per la maggior parte caucasica, trattati con diverse dosi di irinotecano impiegato in monoterapia oppure in regimi di associazione con fluoropirimidine o derivati del platino. Sono presenti anche lavori svolti su altre patologie neoplastiche, quali il carcinoma polmonare, e in popolazioni asiatiche. E' importante sottolineare che la presenza di questa eterogeneità fra gli studi condotti a volte può rendere difficile il loro confronto e può impattare negativamente sulla concordanza dei dati ottenuti.

UGT1A1 è l'isoforma più abbondante nel fegato ed è l'enzima principale coinvolto nella glucuronazione epatica della bilirubina. In particolare, un difetto in questa via metabolica è associato ad uno stato patologico di iperbilirubinemia non coniugata e non emolitica che si può presentare in diversi gradi. Mutazioni genetiche causanti la completa o parziale assenza dell'attività dell'UGT1A1 danno luogo a condizioni molto severe come la Sindrome Crigler-Najjar di tipo I (caratterizzata da livelli anormali di bilirubinemia, incompatibili con la vita) e di tipo II (stato più moderato). La forma più mite è la Sindrome di Gilbert, asintomatica e abbastanza distribuita nella popolazione (circa 15%), che viene associata ad alcune strutture polimorfiche di questo enzima fra cui UGT1A1*28 investigato anche in questa tesi. Fra le varianti geniche di UGT1A1 quella più studiata per la sua significativa implicazione dal punto di vista farmacogenetico è sicuramente **UGT1A1*28** (-53[A(TA)_{6>7}TAA]) che consiste nella variabilità nel numero di ripetizioni del microsatellite TA nel promotore del gene (comunemente nella popolazione caucasica si hanno 7 ripetizioni al posto di 6; nella popolazione Africana sono state riportate anche varianti con 5 o 8 ripetizioni.). Diversi dati di letteratura dimostrano che tale polimorfismo, correlato ad una diminuita espressione genica e, di seguito, ad una diminuita capacità di glucuronazione dell'individuo, è significativamente associato ad un aumento del rischio di sviluppare severa tossicità ematologica (soprattutto neutropenia) e non ematologica (soprattutto diarrea) a seguito di terapia con irinotecano, in particolar modo a dosi medio-elevate di farmaco (>125/150 mg/m²) (Tabella 1.3). Sulla base dei risultati clinici emersi a questo proposito, soprattutto in relazione al rischio di severa neutropenia, nel luglio 2005 la FDA ha deciso di includere nel foglietto informativo che accompagna l'irinotecano una indicazione farmacogenetica, raccomandando un aggiustamento del dosaggio da somministrare al paziente in trattamento con il chemioterapico sulla base del suo genotipo relativamente al polimorfismo UGT1A1*28 (Revised Irinotecan label; American Food and Drug Administration; <http://www.fda.gov>). Studi aggiuntivi sono comunque tuttora in corso al fine di definire in maniera conclusiva il corretto dosaggio da impiegare in ciascun gruppo di pazienti con diverso genotipo per UGT1A1*28, anche in virtù dei risultati emersi recentemente in letteratura su una predisposizione differenziale dei pazienti con genotipo variante non solo allo sviluppo di tossicità ma anche di risposta al trattamento. Per UGT1A1 sono stati investigati altri due polimorfismi del promotore: **UGT1A1*60** (-3279T>G) e **UGT1A1*93** (-3156G>A) (Tabella 1.3). Entrambe le varianti, in LD con UGT1A1*28, sono state correlate ad una riduzione dell'attività di glucuronazione con conseguente impatto sull'effetto farmacologico dell'irinotecano; in particolare le due varianti sembrano predisporre allo sviluppo di tossicità severa, soprattutto neutropenia. Infine,

è importante sottolineare che alcuni studi hanno evidenziato che i livelli di bilirubina prima del trattamento, marcatore fenotipico della funzionalità di glucuronazione di UGT1A1, sono correlati significativamente sia con neutropenia da irinotecano, che con l'esposizione a CPT-11 e SN-38; questo parametro potrebbe quindi rappresentare un altro utile marcatore nella prescrizione e nell'adattamento della dose individuale di irinotecano [105, 106, 107].

Per l'isoforma UGT1A7, non espressa nel fegato ma in altri tessuti extraepatici come il tratto gastrointestinale, sono stati identificati nei caucasici cinque siti polimorfici che in differenti combinazioni possono dar luogo a quattro alleli (Figura 1.5)

Allele	Codon N°	10	11	12	128	129	130	131	132	207	208	209	
UGT1A7*1		CTT	CCC	CTA	TTT	AAT	GAC	CGA	AAA	GTA	TGG	AAC	WT
		L	P	L	F	N	D	R	K	V	W	N	
UGT1A7*4		CTT	<u>CCA</u>	CTA	TTT	AAT	GAC	CGA	AAA	GTA	<u>CGG</u>	AAC	W208R
		L	P	L	F	N	D	R	K	V	<u>R</u>	N	
UGT1A7*2		CTT	CCC	CTA	TTT	<u>AAG</u>	GAC	<u>AAA</u>	AAA	GTA	TGG	AAC	N129K/R131K
		L	P	L	F	<u>K</u>	D	<u>K</u>	K	V	W	N	
UGT1A7*3		CTT	<u>CCA</u>	CTA	TTT	<u>AAG</u>	GAC	<u>AAA</u>	AAA	GTA	<u>CGG</u>	AAC	N129K/ R131K/ W208R
		L	P	L	F	<u>K</u>	D	<u>K</u>	K	V	<u>R</u>	N	

Figura 1.5: Rappresentazione grafica dei siti polimorfici identificati sulla sequenza dell'esone 1 dell'isoforma genica UGT1A7 umana. Il polimorfismo nel codone 11 è silente, invece nei codoni 129, 131 e 208 le varianti geniche causano sostituzione di aminoacidi. I cambiamenti di base sono evidenziati in grassetto rosso e sottolineati, mentre i cambiamenti di aminoacido sono in carattere rosso corsivo e sottolineati.

L'allele **UGT1A7*1** è l'allele wild-type di riferimento; l'allele **UGT1A7*2** presenta tre variazioni (387T>G, 391C>A, 392G>A), in totale LD, che portano al cambio di due amminoacidi (Asn129Lys, Arg131Lys); l'allele **UGT1A7*4** è caratterizzato dalla sostituzione silente 33C>A e dalla variazione missense 622T>C (Trp208Arg) anch'esse in totale LD; infine l'allele **UGT1A7*3** deriva dalla combinazione degli alleli UGT1A7*2 e *4 e presenta la forma variante di tutti e cinque i siti polimorfici. Le varianti dell'UGT1A7, e soprattutto l'UGT1A7*3, sono state correlate *in vitro* ad una consistente perdita di attività catalitica dell'enzima e diversi studi clinici hanno evidenziato un possibile ruolo di tali alleli

varianti nell'influenzare la tossicità e l'efficacia della chemioterapia con irinotecano (Tabella 1.3).

Infine, per l'isoforma UGT1A9, altamente espressa nel fegato e presente in altri numerosi tessuti extraepatici così come UGT1A1, si è analizzata la variante **l'UGT1A9*22** (-118T_{9>10}), caratterizzata dall'inserzione di una timina nella regione promotrice del gene e correlata *in vitro*, anche se i dati sono ancora controversi, ad una maggiore attività enzimatica per A(T)₁₀AT rispetto A(T)₉AT. Anche per tale polimorfismo esistono evidenze sperimentali su un suo possibile impatto sull'effetto farmacologico dell'irinotecano (Tabella 1.3).

Negli ultimi anni diversi dati sono stati inoltre pubblicati riguardo lo studio e la costruzione dei vari aplotipi che possono derivare dalla combinazione dei polimorfismi di UGT1A1, UGT1A7, UGT1A9; l'analisi dell'associazione fra gli aplotipi ricavati e i parametri farmacocinetici e farmacodinamici dell'irinotecano ha dato risultati positivi seppur ancora preliminari [105, 108, 109, 110].

Tabella 1.3: Caratteristiche dei polimorfismi di UGT1A considerati nell'analisi farmacogenetica: tipologia e localizzazione, frequenza dell'allele variante nella popolazione caucasica, effetto fenotipico e ruolo in relazione alla terapia con irinotecano.

POLIMORFISMO (rs ID)	TIPOLOGIA e LOCALIZZAZIONE	FREQUENZA nei CAUCASICI dell'ALLELE VARIANTE (%)**	EFEETTO FENOTIPICO	RILEVANZA CLINICA correlata a terapia con IRINOTECANO
UGT1A1				
-53[A(TA) ₆₋₇ TAA] or *28 (rs8175347)	5'UTR (promotore) ** situato nella regione regolatoria TATA-box a livello del promotore del gene	(TA) ₇ : 30.0 - 40.0	Studi <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> dimostrano una significativa < espressione dell'enzima polimorfico con conseguente riduzione della capacità di glucuronazione e inattivazione di SN-38 [55, 111, 112, 113].	<ul style="list-style-type: none"> • Ruolo nel modulare parametri di PK di CPT-11 e suoi metaboliti [106, 114, 115]. In particolare *28 è associato ad una > esposizione a SN-38, a un > BI e un < GR [106, 115, 116, 117, 118]. • Diversi dati indicano un ruolo significativo nel modulare la tossicità ematologica (neutropenia) e/o non ematologica (diarrea) con un > rischio per la forma variante *28 soprattutto in omozigosi [119]. Tre recenti meta-analisi hanno indicato, inoltre, che tale effetto è evidente soprattutto, o comunque in maniera più marcata, a dosi medio-elevate (>125/150 mg/m²) o elevate (250 mg/m²) di irinotecano [10, 120, 121]. • Dati preliminari evidenziato anche un ruolo nel modulare la risposta tumorale, con un > grado di risposta per *28 [108, 115]. e il TTP e OS con una prognosi migliore per *28 [115, 122].
-3156G>A or *93 (rs10929302)	5'UTR (promotore)	A : 25.0 – 32.0	È stata ipotizzata un'associazione con una riduzione dell'attività enzimatica [105, 123].	<ul style="list-style-type: none"> • Ruolo nel modulare parametri di PK di CPT-11 e suoi metaboliti. [106, 114]. In particolare *93 è associato a una > esposizione a SN-38 [106] e conseguente un < GR [106]. • Impatto su tossicità: *93 è associato a un > rischio di severa tossicità soprattutto ematologica (neutropenia) [99, 106, 123, 124]
-3279T>G or *60 (rs4124874)	5'UTR (promotore)	G : 35.0 - 44.0	Associato ad una marginale riduzione dell'attività enzimatica [105, 125, 126].	<ul style="list-style-type: none"> • Ruolo nel modulare parametri di PK di CPT-11 e suoi metaboliti [106, 114]: *60 sembra essere associato a un < GR [106]. • Impatto su tossicità: *60 è associato a un > rischio di severa tossicità in particolare neutropenia [106, 125].
UGT1A7[§]				
[387T>G, 391C>A, 392G>A in totale LD] or*2 (rs17868323, rs17863778, rs17868324)	Asn129Lys / Arg131Lys (esone 1)	G : 26.0 - 35.0	Vedi UGT1A7*3	Vedi UGT1A7*3

[33C>A, 622T>C in totale LD] or *4 (rs7577677, rs11692021)	Pro11Pro <i>silente</i> / Trp208Arg (esone 1)	C : 43.0 – 48.0	Vedi UGT1A7*3	Vedi UGT1A7*3
[387T>G, 391C>A, 392G>A, 33C>A, 622T>C] or *3	Asn129Lys / Arg131Lys / Trp208Arg	*3 : 35.0 – 40.0	Studi <i>in vitro</i> correlano le varianti dell'UGT1A7, e soprattutto l'UGT1A7*3, ad una consistente perdita di attività catalitica dell'enzima [53, 127, 128]	<ul style="list-style-type: none"> • Ruolo nel modulare parametri di PK di CPT-11 e suoi metaboliti [114, 129]. In particolare *3 è stato associato a un > SN-38 AUC e < GR [130, 131]. • Impatto su tossicità: l'effetto non è del tutto ancora definito [*2 e *3 associati con una < grado di tossicità [108]; al contrario in altri studi con un > grado di tossicità, in particolare diarrea [110, 130, 132]] • Ruolo nel modulare la risposta tumorale: *2 e *3 associati con una > grado di risposta non del tutto confermato [108, 130].
UGT1A9				
(-118T _{9>10}) or *22 (rs45625337)	5'UTR	T ₁₀ : 34.0 – 43.0	Dati <i>in vitro</i> , anche se i dati sono ancora controversi, indicano una > attività enzimatica per A(T) ₁₀ AT rispetto A(T) ₉ AT [133]. Tuttavia tale associazione non è ancora stata del tutto confermata [134, 135].	<ul style="list-style-type: none"> • Ruolo nel modulare parametri di PK di CPT-11 e suoi metaboliti [114, 129]. In particolare (dT)₉ è associato a un > SN-38 AUC e < GR [130, 131]. • Impatto su tossicità: l'effetto non è del tutto ancora definito [(dT)₉ associato con un > rischio di severa tossicità non ematologica, in particolare, diarrea [110, 130, 131]; al contrario un altro studio condotto evidenzia un'associazione con un < tossicità data soprattutto da diarrea [108]] • Ruolo nel modulare la risposta tumorale: con una > grado di risposta per (dT)₉ [108].
** Varie combinazioni di questi polimorfismi di UGT1A presentano fra di loro un significativo grado di linkage disequilibrium; gli aplotipi derivanti dalla combinazione di questi polimorfismi dimostrano un impatto sull'effetto farmacologico di irinotecano [108, 109, 110, 123, 136].				

**Le frequenze alleliche sono state ricavate da NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>) SNP500Cancer (<http://variantgps.nci.nih.gov/cgfseq/pages/snp500.do>) PharmGkb (<http://www.pharmgkb.org/>).

§: per dettagli sulla combinazione dei cinque siti polimorfici vedi la parte relativa del testo.

1.4.3 . UPTAKE ED EFFLUSSO (MDR1, MRP1, MRP2, BCRP, OATP1B1)

Negli ultimi anni un grande interesse è stato posto allo studio del ruolo delle varianti geniche dei trasportatori di membrane nel modulare la farmacocinetica e farmacodinamica di vari agenti terapeutici, fra cui anche l'irinotecano. Queste proteine, infatti, modulando l'uptake e l'escrezione delle molecole substrato dalla cellula, svolgono un ruolo fondamentale nel determinare la biodisponibilità del farmaco, regolandone l'assorbimento, la distribuzione e l'eliminazione, e nel modulare il suo accumulo all'interno della cellula tumorale e non, andando così, infine, ad influenzare la tossicità e l'efficacia dello stesso agente terapeutico.

Esistono due classi di trasportatori: quelli di uptake, che facilitano la traslocazione dei substrati dentro la cellula (es. membri della famiglia OATP come OATP1B1) e quelli di efflusso, che esportano il substrato dal mezzo intracellulare a quello extracellulare, spesso contro gradiente di concentrazione (es. membri della famiglia ABC proteins come MDR1, MRP1, MRP2 e BCRP) [137].

Tali proteine trasportatrici sono localizzate sia in tessuti normali, importanti dal punto di vista farmacologico, quali intestino, fegato reni e cervello, sia nella cellula tumorale, dove l'espressione, innata oppure acquisita, è spesso correlata a fenomeni di resistenza al farmaco [137, 138]. Queste proteine sono inoltre caratterizzate da una espressione cellulare di tipo polarizzato; di fondamentale importanza è, infatti, la corretta localizzazione del trasportatore nello specifico dominio di membrana, apicale o basolaterale, in modo da determinare il giusto movimento vettoriale delle molecole traslocate [137, 139]. Un'altra proprietà delle proteine trasportatrici è quella di presentare una significativa polispecificità e sovrapposizione di substrato che può dare origine a fenomeni di interazione a livello di trasporto fra il farmaco e altre sostanze veicolate dal medesimo carrier di membrana [137, 138, 140].

Alla luce di queste considerazioni si deduce che, per capire la disposizione di un agente terapeutico trasporto-mediata, è importante considerare l'interplay dinamico tra carriers di uptake ed efflusso all'interno di date cellule epiteliali. La traslocazione di un farmaco è, infatti, il risultato dell'azione combinata e spesso complementare di differenti pompe, espresse all'interno di uno specifico dominio di membrana, che va a determinare infine il grado netto e la direzione del movimento attraverso organi quali fegato, reni, intestino.

Anche per i carriers di membrana esistono tutta una serie di inibitori ed induttori della loro attività di trasporto che devono essere impiegati con attenzione quando si intraprende una terapia con un farmaco substrato dello stesso trasportatore. Alcune di queste molecole modulanti sono state anche sperimentate, con risultati preliminari promettenti, come

chemosensibilizzanti, allo scopo di superare fenomeni di resistenza, oppure come strategia per migliorare aspetti farmacocinetici, quali soprattutto l'assorbimento, o farmacodinamici, come lo sviluppo di tossicità [137, 141, 142, 143, 144, 145]. Sono stati evidenziati, inoltre, fenomeni di interazione, a diverso livello biologico, tra i trasportatori ed alcuni enzimi metabolici, come i citocromi, attivi sui medesimi substrati; in letteratura è stata ad esempio descritta una significativa interazione fra MDR1 e CYP3A4, la cui espressione è mutuamente regolata dallo stesso fattore di trascrizione nucleare pregnane X receptor (PXR) [96, 137, 138, 146, 147].

Per quanto riguarda il trasporto dell'irinotecano e dei suoi metaboliti, i dati sperimentali indicano un coinvolgimento soprattutto delle proteine MDR1, MRP1, MRP2, BCRP e OATP1B1 (Tabella 1.4). In particolare, OATP1B1, un trasportatore di uptake espresso a livello del dominio basolaterale delle cellule epatiche, sembra essere il principale responsabile della traslocazione di SN-38 dal plasma verso gli epatociti; MDR1, MRP2 e BCRP, pompe di efflusso localizzate a livello apicale, sembrano, invece, implicati soprattutto nell'eliminazione di CPT-11 e dei suoi metaboliti nella bile o nei reni; MRP1, infine, situato nella membrana basolaterale, è probabilmente coinvolto nell'efflusso di SN-38 dalla cellula, ad esempio epatica, verso lo spazio interstiziale. Un'alterazione geneticamente determinata del grado di espressione, della funzionalità o della specifica localizzazione cellulare di queste proteine carrier può quindi sicuramente influenzare i parametri farmacocinetici ed il risultato clinico di una terapia con irinotecano.

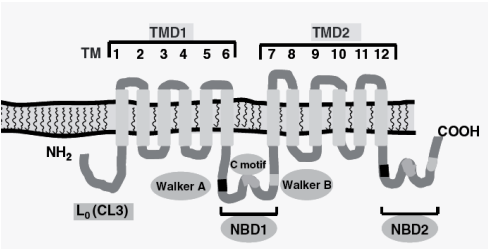
In Tabella 1.4 sono riportate le principali proteine coinvolte nel trasporto di CPT-11 e dei suoi metaboliti; in particolare sono descritte sommariamente la struttura genica e proteica, la localizzazione tissutale, le caratteristiche generali delle molecole substrato ed il ruolo specifico assunto in relazione alla terapia con irinotecano.

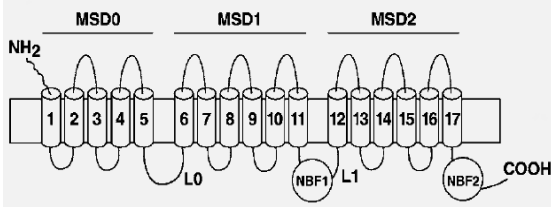
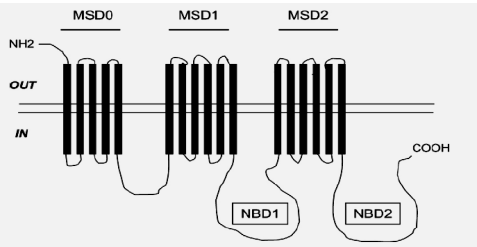
I trasportatori di efflusso, MDR1, MRP1, MRP2 e BCRP, appartenenti come detto alla famiglia delle proteine ABC, comprendente di 48 membri catalogati in 7 sottofamiglie (Human Genome Organization, HUGO), sono glicoproteine integrali di membrana che funzionano come pompe attive ATP-dipendenti e substrato specifiche. Presentano una collocazione e distribuzione tissutale sovrapponibile ed una significativa sovrapposizione in specificità di substrato. Funzionalmente mediano il trasporto, contro gradiente di concentrazione, di un vasto range di molecole sia endogene, come ioni, zuccheri, fosfolipidi, polisaccaridi, amminoacidi e peptici, che esogene, fra cui diverse sostanze carcinogeniche ed agenti terapeutici. Il loro ruolo fisiologico è quello di limitare l'accumulo intracellulare di substrati potenzialmente tossici estrudendoli dalla cellula. Strutturalmente presentano un

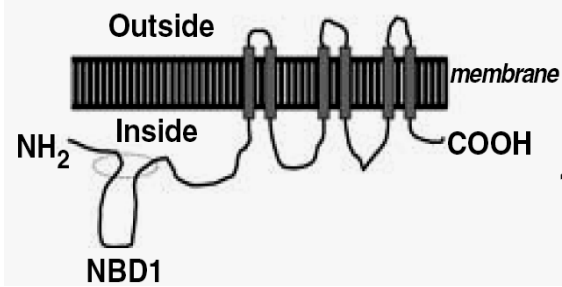
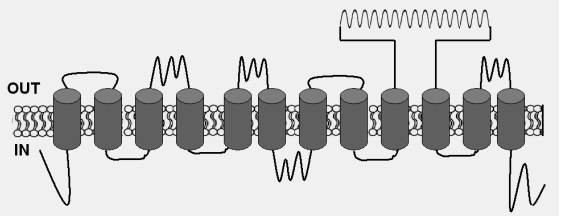
numero variabile di domini transmembrana (TMD) e domini citoplasmatici che legano nucleotidi (NBD); i domini NBDs sono quelli che legano e idrolizzano l'ATP per liberare energia, utilizzata poi per favorire la traslocazione attiva dei vari substrati [140, 148].

Il carrier di uptake, OATP1B1, membro della famiglia OATP per il quale è stato ipotizzato anche un trasporto di carattere bidirezionale, media il trasporto di un vasto range di molecole attraverso un meccanismo sodio-dipendente, non ancora del tutto definito, che sembra essere il risultato di uno scambio anionico [137].

Tabella 1.4: Caratteristiche strutturali e funzionali dei trasportatori di membrana coinvolti nell'uptake ed efflusso di CPT-11 e dei suoi metaboliti.

GENE (PROTEINA)	STRUTTURA	LOCALIZZAZIONE	TIPOLOGIA di SUBSTRATO**	RUOLO in relazione alla TERAPIA con IRINOTECANO	
				SUBSTRATO	EFFETTO
ATP-Binding Cassette (ABC) superfamily [140, 149]					
ABCB1 (MDR1 o P-gp) [146, 147]	<p>- GENE: 29 esoni (27 codificanti) , 28 introni (cromosoma 7)</p> <p>- PROTEINA: 1280aa (170Kda)</p> <p>- STRUTTURA: 2 TDMs (6 α-eliche ciascuno) e 2NBDs (-NH₂ e -COOH citoplasmatici)</p>	<p>TESSUTI NORMALI: a livello APICALE (intestino e colon, fegato, reni, SNC, testicoli, ovaie, placenta)</p> <p>TESSUTO TUMORALE: in maniera intrinseca o acquisita</p>	<p>Composti idrofobici e anfipatici, contenenti uno o più anelli aromatici, di peso molecolare basso, carichi positivamente o neutri.</p> <p>Presenta un vasto range di substrati sia endogeni che esogeni fra cui diverse categorie di farmaci (es. antitumorali di origine naturale).</p>	<p>❖ CPT-11</p> <p>❖ SN-38 (con < affinità)</p> <p>[66, 68, 150, 151, 152, 153].</p>	<p>Eliminazione nella BILE e nelle URINE</p>
	<p>- GENE: 31 esoni, 30 introni (cromosoma 16)</p> <p>- PROTEINA: 1531aa (190KDa)</p> <p>- STRUTTURA: 3 TDMs (5/6 α-eliche ciascuno) e 2 NBDs (-NH₂ e -COOH citoplasmatici)</p>	<p>TESSUTI NORMALI: a livello della membrana BASOLATERALE ubiquitariamente ad eccezione del fegato dove sono stati rilevati bassi livelli d'espressione</p> <p>TESSUTO TUMORALE: in maniera intrinseca o acquisita</p>	<p>Funziona soprattutto da cotrasportatore di anioni organici; trasporta preferenzialmente composti carichi negativamente spesso coniugati con GSH o solfato, glucorinidi e composti immodificati in presenza di GSH; i</p>	<p>❖ CPT-11 (debolmente)</p> <p>❖ SN-38 (forse)</p> <p>[153, 155]</p>	<p>Efflusso dagli epatociti o altro tessuto verso lo SPAZIO INTERSTIZIALE</p>

			Trasporta composti sia endogeni (LCT4 il principale) che esogeni come farmaci (es. prodotti naturali idrofobici neutri o anionici eccetto i tassani)		
ABCC2 (MRP2 o cMOAT) [148, 156, 157]	<p>- GENE: 32 esoni, 31 introni (cromosoma 10)</p> <p>- PROTEINA: 1545aa (190/200KDa)</p> <p>- STRUTTURA: 3 TMDs (5/6 α-eliche ciascuno) e 2 NBDs (-NH₂ extracellulare -COOH citoplasmatico)</p>	<p>TESSUTI NORMALI: a livello APICALE soprattutto nel fegato e, in minor misura, in reni ed intestino.</p> <p>TESSUTO TUMORALE: in maniera intrinseca o acquisita</p>	<p>Composti anionici o coniugati con GSH, Acido Glucuronico o solforico.</p> <p>Presenta come substrati sia molecole endogene (una delle piú importanti è la bilirubina glucuronidata) sia molecole esogene coniugate come alcuni farmaci (es. <i>derivati del platino dopo inattivazione tramite coniugazione con GSH; vincristina, vinblastina doxorubicina, daunorubicina, metrotrexato</i>)</p>	<p>❖ SN-38G</p> <p>❖ SN-38 (forse)</p> <p>❖ CPT-11 (forse ed eventualmente con molto bassa affinità)</p> <p>[68, 150, 153, 158, 159, 160]</p>	<p>Eliminazione nella BILE e nelle URINE</p> <p>PRINCIPALE trasportatore coinvolto nell'ESCREZIONE EPATOBIARE</p>
					
ABCG2 (BCRP) [145]	<p>- GENE: 16 esoni, 15 introni (cromosoma 4)</p> <p>- PROTEINA: 655aa (72KDa)</p> <p>- STRUTTURA: definito un "half-transporter": 1 TMD (6 α-eliche) al -COOH citosolico e 1 NBD al -NH₂ citosolico a formare un OMODIMERO con possibilità di ulteriore oligomerizzazione</p>	<p>TESSUTI NORMALI: cellule trofoblaste della placenta e nella membrana APICALE degli enterociti dell'epitelio del piccolo intestino e colon così come nelle membrane canalicolari epatiche e biliari.</p> <p>TESSUTO TUMORALE: in maniera intrinseca o acquisita</p>	<p>Presenta una specificità di substrato molto ampia riconoscendo sia molecole cariche positivamente che negativamente, anioni organici e coniugati con solfato.</p> <p>Trasporta molecole sia endogene che esogene tipo tossine, chemioterapici e altri farmaci.</p>	<p>❖ SN-38 (fortemente)</p> <p>❖ SN-38G</p> <p>- Implicata in fenomeni di resistenza a SN-38 e SN-38G.</p> <p>[161, 162, 163, 164, 165]</p>	<p>Eliminazione nella BILE e nelle URINE</p>

			<p>- Induzione di ABCG2 dallo stesso trattamento con CPT-11 e conferimento di una resistenza acquisita parzialmente reversibile [161, 166].</p> <p>- non sembra implicato nel trasporti di CPT-11 (forma lattonica) [167].</p>		
Organic Anion-Transporting Polypeptides (OATP) family					
<p>SLCO1B1 (OATP1B1 o OATP-C) [144, 168]</p>	<p>- GENE: 15 esoni (incluso il 1° non codificante), 14 introni. (cromosoma 12)</p> <p>- PROTEINA: 691aa (76KDa)</p> <p>- STRUTTURA: è predetta avere 12 TMDs similmente agli altri membri della famiglia.</p>	<p>TESSUTI NORMALI: Membrana BASOLATERALE degli epatociti umani (un membro della famiglia OATP FEGATO-SPECIFICO) → coinvolto nell'uptake epatocellulare di composti substrato.</p> <p>** Recenti evidenze sembrano suggerire anche un'espressione negli enterociti del piccolo intestino.</p>	<p>Tipologia di substrati endogeni e esogeni molto varia: acidi biliari, molecole coniugate con solfato o glucoronide (es. bilirubina e il suo glucoronide) ormoni tiroidei, peptidi e farmaci come pravastation, metrotrexato e rifampin e SN-38</p>	<p>❖ SN-38</p> <p>❖ CPT-11 (con < affinità e quindi a elevate concentrazioni – trasporto dose dipendente)</p> <p>❖ SN-38G (forse)</p> <p>[169, 170]</p>	<p>Uptake dal plasma verso L'EPATOCITA (TRASPORTO BIDIREZIONALE)</p>
					

****** Per informazioni dettagliate riguardo i substrati e la presenza di eventuali modulatori (inibitori/induttori, agenti revertanti/chemosensibilizzanti) far riferimento alle referenze riportate nella prima colonna.

Di queste proteine trasportatrici negli ultimi anni sono stati descritti diversi polimorfismi genici [138, 171, 172]. Un riassunto di quelli scelti ed inseriti nell'analisi farmacogenetica di questa tesi è presente in Tabella 1.5. Qui sono descritte la tipologia della variazione genica e la sua localizzazione, la frequenza dell'allele polimorfico nella popolazione caucasica e, ove esistono dati sperimentali a riguardo, l'impatto della variante sul fenotipo della proteina. Inoltre sono riportate le evidenze cliniche riguardo un possibile coinvolgimento di tali polimorfismi nel modulare aspetti di farmacocinetica e farmacodinamica di una terapia con irinotecano. In generale, fra gli studi presenti ad oggi in letteratura, esiste una certa eterogeneità; infatti si tratta di indagini condotte su pazienti di etnia asiatica e, in minor misura, caucasica, con tumori solidi avanzati di differente tipologia (neoplasie al polmone, CCR, carcinoma nasofaringei), trattati con irinotecano a diverse dosi ed utilizzato da solo o in associazione con altri agenti antineoplastici come 5-FU/LV e cisplatino. In Tabella 1.5 si è focalizzata l'attenzione sulle evidenze positive riguardo il ruolo dei vari polimorfismi nel modulare diversi aspetti della terapia con irinotecano; esistono tuttavia anche dati inconsistenti [59, 76, 77].

Il set di marker genetici analizzato nel lavoro di tesi è costituito da 39 polimorfismi scelti seguendo i criteri precedentemente descritti. Fra queste ci sono variazioni missense, che portano ad un cambiamento di amminoacido con possibile impatto sulla funzionalità della proteina, sostituzioni silenti o sinonime, che possono alterare indirettamente l'attività del trasportatore modificandone il folding e la conformazione tridimensionale ed, infine, polimorfismi che cadono in zone non tradotte del gene (5'UTR, 3'UTR, introniche) che possono modulare la regolazione di processi quali la trascrizione, la traduzione e lo splicing e il processamento del mRNA [172, 173, 174]. E' importante sottolineare che, a volte, l'alterazione fenotipica associata a un determinato polimorfismo può non essere dovuta al suo diretto effetto sulla proteina ma piuttosto riflettere il linkage con un'altra variante che è realmente la causa della correlazione osservata.

Per MDR1, conosciuto anche come P-gp e codificato dal gene ABCB1, sono state introdotte 9 varianti polimorfiche (Tabella 1.5-A). Fra queste le più studiate e quelle per cui esistono più dati sperimentali sono tre: le due variazioni silenti 3435C>T e 1236C>T e la sostituzione missense 2677G>T/A, fra loro in elevato grado di LD [175, 176]. In particolare, per 3435C>T e 2677G>T/A sono stati pubblicati in questi anni un numero veramente considerevole di lavori riguardo l'impatto della variante sia sui livelli di espressione e funzionalità della proteina che sull'efficienza di trasporto di vari substrati fra cui anche diversi chemioterapici; tali analisi hanno tuttavia generato un pool di dati così eterogeneo e vario, con risultati spesso

contrastanti tra loro, che ad oggi il ruolo di questi due polimorfismi rimane ancora piuttosto controverso [138, 149, 171, 173, 175, 176, 177, 178]. La significativa disomogeneità esistente tra i dati pubblicati può essere dovuta alle differenti condizioni sperimentali impiegate nei diversi studi sia *in vitro* che *in vivo*. Ad esempio sussistono differenze nelle tipologia di linee cellulari utilizzate e/o del tessuto e tumore analizzato, nel substrato/farmaco considerato, con relativa differente specificità, e nelle sue modalità di somministrazione (numero di somministrazioni, dose di substrato con possibilità di saturazione del trasportatore e mascheramento di effetti geneticamente determinati), nella metodica analitica usata per valutare sia l'espressione della proteina che parametri biochimici e farmacocinetici/farmacodinamici correlati, nel possibile utilizzo concomitante di inibitori o induttori del trasportatore stesso ed ancora nelle dimensioni del campione d'indagine e nell'etnia e nelle caratteristiche clinico-demografiche della popolazione di studio. Inoltre, quando si valuta *in vivo* la rilevanza di determinanti genetici bisogna considerare che entrano in gioco diversi fattori legati al complesso interplay di processi biologici, non stimati nell'ambiente controllato della sperimentazione *in vitro*, che aggiungono ulteriore difficoltà nell'interpretazione dei dati ottenuti. Alla luce di queste osservazioni è difficile definire esattamente l'effetto del polimorfismo in maniera univoca e universalmente valida; tale impatto fenotipico deve essere piuttosto valutato di volta in volta in base al tipo di substrato e contesto biologico considerato. Diversi dati, supportano, infine, la validità di un approccio aplotipico che analizzi contemporaneamente l'effetto combinato delle tre varianti 3435C>T, 1236C>T e 2677G>T/A in relativo LD fra loro [138, 171, 176]. Per MDR1, oltre a queste tre varianti, si sono analizzati altri 6 polimorfismi per cui esistono solo pochi dati preliminari che li rendono però buoni candidati per un'indagine farmacogenetica di una terapia con irinotecano.

Per MRP1, codificato dal gene ABCC1, sono state valutate 10 varianti genetiche (Tabella 1.5-B). I polimorfismi descritti per questo trasportatore sono stati individuati essenzialmente in relazione alle basi genetiche del Pseudoxanthoma Elasticum. (PXE). Si tratta per lo più di variazioni silenti o situate in zone introniche o non codificanti adiacenti alle regioni di confine esone/introne. Le poche sostituzioni missense descritte presentano una frequenza relativamente bassa e i soggetti portatori della variante sono essenzialmente eterozigoti. Ad oggi, l'effetto funzionale di tali polimorfismi non è ancora del tutto stato caratterizzato e anche riguardo la loro rilevanza fisiologica e clinica esistono per ora solo pochi dati sparsi e preliminari [172].

Per MRP2, conosciuto anche come cMOAT e codificato dal gene ABCC2, sono stati analizzati 10 markers genetici (Tabella 1.5-C). Questo trasportatore è stato studiato essenzialmente in associazione alla sindrome di Dubin-Johnson (DJS), una malattia autosomica recessiva che porta ad una inadeguata escrezione epatobiliare con conseguente iperbilirubinemia coniugata, e l'analisi della sua sequenza genica ha portato all'individuazione di molteplici variazioni che vanno ad alterare in vario modo la funzionalità ed il livello d'espressione della proteina. In particolare, fra i polimorfismi analizzati i più studiati ed investigati sono tre: -24C>T, 1249G>A e 3972C>T. Anche in questo caso, come per le varianti di MDR1, benché l'impatto fenotipo di tali markers genetici sia stato abbastanza caratterizzato, esiste comunque un significativo effetto tessuto e substrato specifico che comporta la presenza di dati sperimentali a volte fra loro divergenti o non del tutto sovrapponibili [149, 172, 176]. Inoltre è stata anche riportata (es. -24C>T e 3972C>T [179]) una discrepanza tra il ruolo del polimorfismo quando studiato in singolo oppure in un approccio aplotipico suggerendo, quindi, un significativo interplay dinamico tra le diverse varianti, con effetti reciproci revertanti e complementari a dare infine il fenotipo osservato. È importante evidenziare che, nella popolazione caucasica, è stato descritto ed analizzato, con risultati preliminari significativi soprattutto in relazione alla terapia con irinotecano, l'aplotipo costituito da 6 varianti (-24C>T, 1249G>A, 3972C>T, -1549G>A, -1019A>G, IVS26-34T>C) tra loro in diverso grado di LD. Nell'analisi farmacogenetica si sono introdotte, infine, altre 4 varianti di MRP2 per cui esistono delle evidenze cliniche importanti anche se non in relazione alla terapia con irinotecano.

Per la proteina BCRP, codificata dal gene ABCG2, si sono investigati 7 polimorfismi (Tabella 1.5-D). Tra questi i più analizzati sono le due sostituzioni missense 421C>A e 34G>A. Evidenze sperimentali *in vitro* ed *in vivo* hanno portato a formulare diverse ipotesi riguardo il possibile meccanismo molecolare correlato all'effetto funzionale di tali polimorfismi senza però generare una risposta conclusiva; al contrario i dati pubblicati dimostrano in maniera inequivocabile che il ruolo di queste due variante è significativamente legato al tipo di substrato/farmaco considerato. Per gli altri polimorfismi considerati, essendo stati descritti in tempi relativamente recenti, sono presenti in letteratura solo alcuni dati preliminari che suggeriscono tuttavia una loro possibile rilevanza clinica.

Infine, per il trasportatore OATP1B1, codificato dal gene SLCO1B1, sono stati analizzati tre varianti polimorfiche che si combinano tra loro a dare due diversi aplotipi funzionalmente e clinicamente rilevanti, *15 e *17 (Tabella 1.5-E). Anche in questo caso, per i due marker genetici più studiati, 521T>C e 388A>G, sono stati ipotizzati diversi meccanismi di

alterazione del fenotipo della proteina e si è dimostrato un effetto altamente substrato specifico. Diverse evidenze sperimentali indicano, inoltre, che l'aplotipo OATP1B1*15, derivante dalla combinazione dei due polimorfismi, presenta un impatto più forte e rilevante rispetto alle singole varianti. Per -11187G>A esistono ancora pochi dati che comunque suggeriscono un ruolo importante dal punto di vista farmacologico anche in relazione a terapia con irinotecano.

Una descrizione dettagliata di tutti i markers genici inseriti nel lavoro di questa tesi, con le relative referenze bibliografiche, è presente in (Tabella 1.5).

Nonostante una certa eterogeneità fra gli studi presenti ad oggi in letteratura, variazioni genetiche associate ad una alterata funzionalità di trasporto delle proteine coinvolte nell'uptake ed escrezione di irinotecano e dei suoi metaboliti, sono validi candidati per un'analisi genetica tesa a determinare i fattori modulanti l'effetto farmacologico dell'inibitore topoisomerasico.

Tabella 1.5: Caratteristiche dei polimorfismi dei trasportatori di membrana considerati nell'analisi farmacogenetica: tipologia e localizzazione, frequenza dell'allele variante nella popolazione caucasica, effetto fenotipico e ruolo in relazione alla terapia con irinotecano.

POLIMORFISMO (rs ID)	TIPOLOGIA e LOCALIZZAZIONE	FREQUENZA nei CAUCASICI dell'ALLELE VARIANTE (%)**	EFEETTO FENOTIPICO	RILEVANZA CLINICA correlata a terapia con IRINOTECANO
(A) ABCB1				
3435C>T or *6 (rs1045642)	Ile1145Ile (esone 26)	T : 46.8 - 62.5	Dati <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> evidenziano un impatto fenotipico con esiti eterogenei e contrastanti [149, 175, 176] (<i>vedi testo per dettagli</i>).	<ul style="list-style-type: none"> • Impatto su PK di CPT-11, SN-38G e SN-38, sia in singolo che in aplotipo con ABCB1 2677G>T/A, che suggerisce una > attività di efflusso relativo a irinotecano e suoi metaboliti per il trasportatore polimorfico [180, 181]. • Impatto su tossicità: [T: > rischio di severa diarrea e tossicità precoce (neutropenia) [124, 180, 182]].
1236C>T or *8 (rs1128503)	Gly412Gly (esone 12)	T : 38.6 - 47.7	Effetto ancora da definire [173]. Ipotizzato per il genotipo variante in omozigosi un impatto indiretto sulla stabilità dell'mRNA [183].	<ul style="list-style-type: none"> • Impatto su PK di CPT-11 e SN-38 [T: > esposizione a CPT-11 e SN-38 [86]]. • Impatto su tossicità. [C: in combinazione con altri SNPs: > tossicità severa e neutropenia] [184]. • Possibile impatto su PFS e OS [182].
2677G>T/A or *7 (rs2032582)	Ala893Ser/Thr (esone 21) ** situato in loop intracellulare adiacente all' 11° TMD importante per il legame al farmaco e idrolisi dell'ATP [185, 186].	T : 33.9 - 43.5 A : 0.0 - 4.2	Cambio aa (Ala→Ser/Thr) con caratteristiche chimico-fisiche molto differenti → possibile alterazione della geometria del sito di interazione e della struttura secondaria [187]. Dati <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> evidenziano un impatto fenotipico con esiti eterogenei e contrastanti [149, 175, 176] (<i>vedi testo per dettagli</i>).	<ul style="list-style-type: none"> • Impatto su PK di CPT-11, SN-38, SN-38G e vari metaboliti minori che suggerisce una > attività di efflusso per il trasportatore polimorfico (vedi anche ABCB1 3435C>T) [89, 106, 131, 180]. • Impatto su tossicità sia sulla diarrea [T: > rischio di diarrea severa [89] che soprattutto sulla neutropenia con un effetto però non ancora concordemente definito [89, 131, 180].

<p style="text-align: center;">Linkage Disequilibrium : 3435C>T, 1236C>T, 2677G>T/A [86, 181, 188]</p>		<p>TTT (*2) : 62.0 [188]</p>	<p>Dati <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> evidenziano un effetto combinatoriale dei tre SNPs, descritto dal relativo aplotipo, con un significativo impatto sui livelli di espressione (mRNA o proteina) e conseguente alterazione della biodisponibilità dei substrati. L'effetto osservato è substrato-specifico. [176].</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Impatto su PK di CPT-11, SN-38G e SN-38 in termini di AUC e Cmax. [180, 181, 189]. L'aplotipo T/T/T (*2) porta ad una < clearance renale di CPT-11 e dei suoi metaboliti. [189]. • Impatto su tossicità: [T/T/T (*2): > tossicità precoce] [182]. • Impatto su risposta e OS: [T/T/T (*2): < risposta e OS] [182].
<p>1199G>A (rs2229109)</p>	<p>Ser400Ser (esone 11)</p>	<p>A : 2.1 - 5.5</p>	<p>No effetto sui livelli di espressione/o localizzazione. Studi <i>in vitro</i> evidenziano un impatto substrato-specifico sull'efflusso e permeabilità transepiteliale di farmaci substrato (effetto > in direzione apicale vs basolaterale) e nel modulare la resistenza a specifici farmaci (vinblastina, vincristina, paclitaxel etc) [190].</p>	<p>----- nessun dato -----</p>
<p>-129T>C (rs3213619)</p>	<p>5'UTR</p>	<p>C : 4.8 - 6.2</p>	<p>----- nessun dato -----</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Suggesto un possibile ruolo significativo nel modulare parametri di PK di CPT-11 e suoi metaboliti [114].
<p>IVS4-25G>T (rs2235015)</p>	<p>Introne4</p>	<p>T : 23.3 - 30.7</p>	<p>----- nessun dato -----</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Suggesto un possibile ruolo marginale nel modulare parametri di PK di CPT-11 e suoi metaboliti [114].
<p>IVS9-44A>G (rs10276036)</p>	<p>Introne 9</p>	<p>G : 37.5 - 50.0</p>	<p>----- nessun dato -----</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Impatto significativo su PK di SN-38 [G: < AUC] [106].
<p>IVS13+24C>T (rs2235033)</p>	<p>Introne 13</p>	<p>T : 47.4 - 53.2</p>	<p>----- nessun dato -----</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Suggesto un possibile ruolo significativo nel modulare parametri di PK di CPT-11 e suoi metaboliti [114].
<p>IVS14+38A>G (rs2235013)</p>	<p>Introne 14</p>	<p>G : 46.6 – 57.1</p>	<p>----- nessun dato -----</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Suggesto un possibile ruolo significativo nel modulare parametri di PK di CPT-11 e suoi metaboliti [114].
<p>(B) ABCC1</p>				
<p>2012G>T (rs45511401)</p>	<p>Gly671Val (esone 16) ** situato vicino il Walker A motif del 1° NBD [191].</p>	<p>T : 9.5</p>	<p>Studi <i>in vitro</i> non evidenziano un marcato effetto su specificità di substrato o affinità/ efficienza di trasporto per substrati (es. LTC4, E217βG, estrone solfato) [191]. Evidenziato un ruolo <i>in vivo</i> nel modulare ACT acuta dopo terapia con doxorubicina [192].</p>	<p>----- nessun dato -----</p>
<p>1303C>A (rs60782127)</p>	<p>Arg433Ser (esone 10) ** situato loop citoplasmatico</p>	<p>A : 1.17</p>	<p>Studi <i>in vitro</i> evidenziano un effetto substrato specifico: < attività di trasporto ATP-dipendente di LCT4 e estrone solfato, > attività invece nella</p>	<p>----- nessun dato -----</p>

	che connette la regione transmembrana (TM)7 con (TM)8 in TMD2 [193].		resistenza verso doxorubicina; inalterato il fenomeno di resistenza agli alcaloidi della vinca. [193]. Nessun effetto in altri studi. [194].	
2158G>A (rs4148356)	Arg723Gln (esone 17)	A : 0.8 - 2.6	Studio <i>in vitro</i> : leggera < attività di trasporto per LTC4, 17βglucuronide e metotrexato.[194].	----- nessun dato -----
1062T>C (rs35587)	Asn354Asn (esone 9)	C : 28.3 - 45.8	----- nessun dato -----	<ul style="list-style-type: none"> Suggerito un possibile ruolo significativo nel modulare parametri di PK di CPT-11 e suoi metaboliti [114].
1684C>T (rs35605)	Leu562Leu (esone 13)	T : 8.3 - 17.5	----- nessun dato -----	<ul style="list-style-type: none"> Suggerito un possibile ruolo significativo nel modulare parametri di PK di CPT-11 e suoi metaboliti [106, 114]. In particolare l'allele T è associato a < SN-38 AUC e > GR [SN-38G AUC/SN38 AUC] [106].
4002G>A (rs2230671)	Ser1334Ser (esone 28)	A : 19.5 - 31.2	----- nessun dato -----	<ul style="list-style-type: none"> Suggerito un possibile effetto significativo su vari aspetti del pathway farmacocinetico di di CPT-11 e suoi metaboliti [114].
-260G>C (rs504348)	Regione al 5'	C : 15.8 – 23.4	Studio <i>in vitro</i> : il promotore 260G presenta una < attività di espressione rispetto 260C [195].	----- nessun dato -----
IVS11-48C>T (rs3765129)	Introne 11	T : 13.8 - 22.7	----- nessun dato -----	<ul style="list-style-type: none"> Impatto su tossicità: [T: > rischio di neutropenia severa]
IVS18-30G>C (rs2074087)	Introne 18	C : 4.2 - 15.5	----- nessun dato -----	<ul style="list-style-type: none"> Ruolo nel modulare parametri di PK di CPT-11 e suoi metaboliti [106, 114]. In particolare l'allele C è associato a > GR [SN-38G AUC/AN38 AUC] [106].
IVS30+18G>A (rs212088)	Introne 30	A : 20.5 – 21.4	----- nessun dato -----	<ul style="list-style-type: none"> Suggerito un possibile ruolo significativo nel modulare parametri di PK di CPT-11 e suoi metaboliti [114].
(C) ABCC2				
-24C>T (rs717620)	5'UTR	T : 15.0 – 23.2	La maggior parte dei dati <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> suggeriscono una < attività del promotore e/o espressione della proteina per alterazione della stabilità dell' mRNA o dell'affinità di legame di potenziali fattori di trascrizione [149, 176]. Tuttavia la presenza anche di studi inconclusivi conferma la difficoltà nel determinare <i>in vivo</i> un effetto fenotipico spesso substrato e tessuto specifico.	<ul style="list-style-type: none"> Possibile effetto più o meno tendenziale su PK di CPT-11 e dei suoi metaboliti [106, 114, 181]. In particolare l'allele T è significativamente associato ad una > CPT-11 AUC [106] Impatto su risposta tumorale e PFS [T: > risposta e PFS in singolo e in combinazione con 3279C>T] [180].

<p>1249G>A (rs2273697)</p>	<p>Val417Ile (esone 10) ** situato nel TDM2 [196].</p>	<p>A : 14.6 – 23.7</p>	<p>Vista la localizzazione si presuppone possa cambiare la specificità di substrato [196].</p> <p>Studi <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> evidenziano inoltre un possibile effetto sull'espressione della proteina con esiti però diversi in base al tessuto considerato; in generale sembra comunque essere associato con > livelli di espressione. E' stata infine riportata un'alterazione dell'attività di trasposto di diverse molecole e farmaci con un effetto substrato-specifica [149, 172, 176].</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Ruolo nel modulare parametri di PK di CPT-11 e suoi metaboliti [114, 179]. In particolare l'allele A è associato a una < CPT-11 AUC sia in singolo che in combinazione con altri ABCC2 SNPs [179].
<p>3972C>T (rs3740066)</p>	<p>Ile 1324Ile (esone 28)</p>	<p>T : 34.2 – 38.0</p>	<p>No evidenze sperimentali per un effetto sull'attività del trasportatore o sui livelli di espressione [197]. E' stato tuttavia ipotizzato un ruolo nell'aumentare l'attività del trasportatore [198]. L'impatto di questo polimorfismo sembra correlato a quello di -24C>T con cui è in LD [149, 176, 198, 199, 200]. Infine è stato descritto un ruolo nell'influenzare lo sviluppo di intrahepatic cholestasis of pregnancy (ICP) [201]</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Ruolo nel modulare parametri di PK di CPT-11 e suoi metaboliti [106, 114, 179, 202]. In particolare l'allele T è associato a una > SN-38G e APC AUC [106]. • Impatto su tossicità. [C: > rischio di severa diarrea][131]. • Impatto su risposta tumorale e PFS [T: > risposta e PFS in singolo e in combinazione con 3279C>T] [180].
<p>-1549G>A (rs1885301)</p>	<p>Regione al 5'</p>	<p>A : 37.9 – 40.0</p>	<p>Vedi sotto aplotipo ABCC2</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Possibile ruolo nel modulare parametri di PK di CPT-11 e suoi metaboliti [106, 114]. In particolare l'allele A è associato a una > CPT-11 e APC AUC [106].
<p>-1019A>G (rs2804402)</p>	<p>Regione al 5'</p>	<p>G : 37.3 – 43.2</p>	<p>Vedi sotto aplotipo ABCC2</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Possibile ruolo nel modulare parametri di PK di CPT-11 e suoi metaboliti [106, 114]. In particolare l'allele G è associato a una > APC AUC [106].
<p>IVS26-34T>C (rs17216177)</p>	<p>Introne 26</p>	<p>C : 4.0 – 6.7</p>	<p>Vedi sotto aplotipo ABCC2</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Suggesto un possibile ruolo marginale nel modulare parametri di PK di CPT-11 e suoi metaboliti [114].

<p style="text-align: center;">Linkage Disequilibrium :</p> <p style="text-align: center;">-1549G>A, -1019A>G, -24C>T, 1249G>A, IVS26-34T>C, 3972C>T</p> <p style="text-align: center;">[203]</p>		<p>GGCGTC (*2): 38.5 [203](</p>	<p>Varie combinazioni dei polimorfismi che compongono l'aplotipo sono in LD fra di loro con un possibile effetto sui livelli di espressione di mRNA/proteina [176, 180, 197, 199, 200, 203]. Per l'aplotipo composto dalle 6 varianti elencate è ipotizzato un impatto negativo sull'attività della proteina [203].</p>	<ul style="list-style-type: none"> ❖ ABCC2 aplotipo *2 [203] • Ridotta clearance di CPT-11 • Ridotto rischio di severa diarrea (in sottogruppo di pazienti senza l'allele UGT1A1*28) ❖ La combinazione aplotipica dei 6 SNPs correla significativamente anche con SN-38GAUC/SN-38AUC e neutropenia [204].
<p>-1023G>A (rs7910642)</p>	<p>Regione al 5'</p>	<p>A : 10.5 – 21.0</p>	<p>----- nessun dato -----</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Ruolo nel modulare parametri di PK di SN-38. [A: < SN-38 AUC sia in singolo che in combinazione con altri ABCC2 SNPs] [179].
<p>4544G>A (rs8187710)</p>	<p>Cys1515Tyr (esone 32) <i>** localizzazione in una zona importante per il trasporto dei substrati [198].</i></p>	<p>A : 5.9 – 10.4</p>	<p>La proteina polimorfica mostra livelli alterati di espressione con esiti non ancora del tutto definiti [199, 200, 205]. Ruolo nel modulare ACT acuta dopo terapia con doxorubicina[192] e la suscettibilità verso il nonalcolic fatty liver disease (NAFLD)[206].</p>	<p>----- nessun dato -----</p>
<p>3662T>A (rs17222723) ** forte LD con 4544G>A</p>	<p>Val1188Glu (esone 25)</p>	<p>A : 4.6 – 8.1</p>	<p>Riferirsi a 4544G>A. Effetto fenotipico e funzionale sovrapponibile a quello di 4544G>A col quale è in forte LD.[192, 205, 206].</p>	<p>----- nessun dato -----</p>
<p>IVS23+56C>T (rs4148396)</p>	<p>Introne 23</p>	<p>T : 34.2 – 43.8</p>	<p>No evidenze sperimentali sull'effetto fenotipico. Ruolo nel modulare il rischio di tossicità dose-relata a seguito di terapia con metotexatre in maniera etnico-specifica [207].</p>	<p>----- nessun dato -----</p>
<p>(D) ABCG2</p>				

<p>421C>A (rs2231142)</p>	<p>Lys141Gln (esone 5) <i>** Situato in NBD. Cambio di polarità dell'aa (- vs +) [208]. che altera la struttura terziaria con >suscettibilità alla degradazione [209].</i></p>	<p>A : 4.5 – 11.7</p>	<p>Studi <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> evidenziano varie ipotesi: < espressione della proteina (<i>non confermata in altri studi suggerendo quindi un effetto tessuto specifico</i>), < stabilità della proteina e/o < attività ATPasica del trasportatore senza cambiamenti nei livelli di mRNA. La maggior parte degli studi induce per la variante genetica una < funzionalità del trasportatore [172].</p> <p>Ruolo nel modulare fenomeni di resistenza in maniera farmaco-specifica [208, 210]: in particolare è stata riportata <i>in vitro</i> una < resistenza ed un > accumulo dentro la cellula per un < efflusso per gli inibitori delle topoisomerasi I [210] ed una > sensibilità verso SN-38 [208].</p> <p>Influenza significativa su PK e outcome clinico di terapia con vari farmaci anche antitumorali (es. gefitinib, etoposide, gemcitabina, derivati del platino, sunitinib, imatinib etc) con effetto substrato-specifico [145, 172, 211, 212, 213].</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Ruolo nel modulare parametri di PK di CPT-11 e dei suoi metaboliti. [A: > REC media, SN-38G AUC e SN-38 AUC sia in singolo che in combinazione con ABCG2 CTCAde] [214]. • Suggestivo un possibile impatto sulla tossicità in particolare neutropenia [A: > rischio di severa neutropenia [89].
<p>34G>A (rs2231137)</p>	<p>Val12Met (esone 2) <i>** Situato in regione NH2-ter; entrambi gli aa sono non carichi e idrofobici [208].</i></p>	<p>A : 1.7 – 10.3</p>	<p>Studi <i>in vitro</i> evidenziano una lieve < espressione o un'alterata localizzazione apicale alla membrana plasmatica o del trasporto ad essa; esistono anche una serie di studi che non confermano tali osservazioni lasciando ancora da definire l'esatto ruolo di questo polimorfismo [172].</p> <p>Ruolo nel modulare fenomeni di resistenza in maniera farmaco-specifica [208, 210]. Studi <i>in vitro</i> evidenziano in particolare una < resistenza ed un > accumulo dentro la cellula per un < efflusso per gli inibitori delle topoisomerasi I [210] mentre una > resistenza è stata riportata verso SN-38 [208].</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Ruolo borderline nel modulare parametri di PK di terapia con CPT-11 [A: trend verso > esposizione sistemica a CPT-11[181]]. • Impatto su tossicità: l'allele A predispone significativamente a un > rischio di severa diarrea [131] e a un < rischio di neutropenia [89]. • Associato a resistenza a regime FOLFIRI [A: > rischio di resistenza) [215].
<p>-19572/19569 CTCAdeI (rs3219191)</p>	<p>5'UTR</p>	<p>del : 54.0</p>	<p>Possibile effetto negativo sui livelli di espressione della proteina [181]. E' stato ipotizzato che l'attività trascrizionale possa essere ridotta per la presenza di elementi regolatori positivi in questa regione [216, 217].</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Ruolo nel modulare aspetti di PK di terapia con CPT-11 [CTCA: > REC rispetto la variante deleta] [181].
<p>-15994G>A</p>	<p>5'UTR</p>	<p>A : 7.0 – 27.5</p>	<p>Associato con una > espressione in tessuti multipli .E' stato predetto ottenere un sito per HNF4,</p>	<p>----- nessun dato -----</p>

(rs7699188)			un TF coespresso con BCRP in vari tessuti (es fegato e intestino) [218].	
-15622C>T (novel)	5'UTR	T : 3.0	Associato con un < espressione in tessuti multipli. [218]. Effetto su PK e/o su tossicità da terapia con erlotinib o sunitinib da solo o in associazione con ABCG2 1143C>T [219, 220].	----- nessun dato -----
16702G>A (rs2046134)	Introne 1	A : 15.0	Associato con una > espressione nel fegato. E' stato predetto ottenere un sito per GATA4, un TF importante per lo sviluppo dell'intestino e fegato. [218]. Effetto su tossicità da terapia con erlotinib [219].	----- nessun dato -----
1143C>T (rs2622604)	Introne 1	T : 45.8	Associato con una < espressione in intestino. [218]. Effetto su PK e/o su tossicità da terapia con erlotinib o sunitinib da solo o in associazione con ABCG2 1143C>T[219, 220].	Impatto su tossicità: l'allele T predispone significamene a un > mielosoppressione [221].
** Varie combinazioni di questi sette polimorfismi di ABCG2 presentano un significativo grado di linkage disequilibrium [216, 219, 220].				
(E) SLCO1B1				
521T>C or *5 (rs4149056)	Val174Ala (esone 6) ** E' presupposto essere localizzato nel 4° dominio TM [168].	C : 8.3 – 19.4	La maggior parte degli studi <i>in vitro</i> indica una < attività di uptake per diversi substrati compreso SN-38 [169] (ipotesi: <espressione e/o alterazione nell'affinità e efficienza del trasportatore) [144, 168, 222]. Studi <i>in vivo</i> : alterazione dell'attività del trasportatore che si manifesta con un impatto sulla PK di diversi substrati (pravastatin, fexofenadine, repaglidine etc.) producendo generalmente un aumento della concentrazione plasmatici. L'impatto farmacodinamico rimane ancora da definire [144, 168, 222].	<ul style="list-style-type: none"> Impatto su PK di CPT-11 e suoi metaboliti [106, 131, 204, 223]. In particolare l'allele C è associato ad una > CPT-11 AUC [106] e ad una > SN-38 AUC [131, 223] che suggerisce una < attività di uptake epatico per il trasportatore polimorfico. Impatto su tossicità: l'allele C predispone significamene a un > rischio di severa neutropenia [89, 131, 223]; un altro studio evidenzia invece un ruolo protettivo per C verso tossicità severa e in un modello combinato, neutropenia [184].
388A>G or *1b (rs2306283)	Asn130Asp (esone 5) ** Situato nel 2° loop extracellulare [168].	G : 39.2 – 43.5	Ipotetica alterazione nel riconoscimento del substrato. Minimale effetto sulla localizzazione della proteina con sua ritenzione intracellulare, forse per interazione con altre proteine coinvolte nel sorting. L'effetto <i>in vitro</i> del polimorfismo non è tuttavia	<ul style="list-style-type: none"> Possibile ruolo nel modulare parametri di PK di CPT-11 e suoi metaboliti [114, 170]. Impatto su tossicità: [G: > rischio di severa diarrea [223] e < rischio di neutropenia [106].

			ancora stato chiarito a causa della presenza di dati divergenti, dovuti forse ad un impatto substrato-specifico, ed al fatto che l'impatto sul fenotipo della proteina sembra essere minimale [144, 168, 222]. Studi <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> evidenziano una alterazione dell'attività di trasporto e della cinetica di trasporto con esiti diversi (>, <, =) in maniera substrato-specifica [144, 168, 222].	
-11187G>A (rs4149015)	5'UTR	A : 4.0 – 25.0	Ipotizzato un < effetto di uptake epatico [224]. Alterazione nella PK di pravastatin (forse dovuta all'associazione con 521T>C in aplotipo *17) epatico [224, 225].	<ul style="list-style-type: none"> • Impatto su PK di CPT-11, SN-38G e SN-38 [A: > SN-38 AUC e < SN-38 clearance [131, 223]. • Possibile Impatto su tossicità: [A: possibile ruolo nel predisporre a un > rischio di severa neutropenia [131, 223].
*15 [388A>G + 521T>C]		*15 : 5.0 - 14.0	Studi <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> : la maggior parte dei dati evidenzia una marcata < attività di trasporto (più che i singoli SNPs), con alterazione nella PK di vari substrati (es. SN-38 [169, 170]; il grado di influenza è substrato-specifico. L'impatto farmacodinamico rimane ancora da definire [144, 168, 222].	<ul style="list-style-type: none"> • Impatto su PK di CPT-11, SN-38G e SN-38 [*15: > SN-38 AUC [170, 223] > CPT-11 AUC e < CPT-11 clearance [170], < SN-38G AUC [170]. • Possibile Impatto su tossicità (neutropenia) [89].
*17 [388A>G + 521T>C + -11187G>A]		*17 : 4.0	Studi <i>in vivo</i> evidenziano una < attività di uptake con alterazione nella PK di pravastatin [224, 225].	<ul style="list-style-type: none"> • Impatto su PK di CPT-11, SN-38G e SN-38 [*17: trend verso un > SN-38 AUC [223]. • Possibile Impatto su tossicità [*15: > neutropenia] [89].

** Le frequenze alleliche sono state ricavate da NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>) SNP500Cancer (<http://variantgps.nci.nih.gov/cgfseq/pages/snp500.do>) PharmGkb (<http://www.pharmgkb.org/>).

2. SCOPO DELLA TESI

La terapia con FOLFIRI (irinotecano, 5-fluorouracile e leucovorina) viene utilizzata per il trattamento di prima linea del tumore del colon retto metastatico ed è caratterizzata da una notevole variabilità interindividuale in termini di tossicità e risposta tumorale che ne limita in certi casi l'utilizzo. La farmacogenetica si è dimostrata uno strumento utile nella personalizzazione del trattamento con irinotecano, e marcatori genetici come l'UGT1A1*28 sono riconosciuti dalla comunità scientifica internazionale e dagli organi regolatori del farmaco come test molecolari in grado di guidare la somministrazione del farmaco. Risultati importanti sono stati già prodotti da questo gruppo di ricerca riguardo l'impatto di UGT1A1*28 sulla terapia con FOLFIRI. Scopo di questa tesi è quello di definire il ruolo di un set di ulteriori varianti genetiche che caratterizzano i pathways cellulari di metabolismo e trasporto di irinotecano, in associazione ad UGT1A1*28, nel modulare l'esito di una terapia con regime FOLFIRI in pazienti con CCR metastatico.

Gli obiettivi principali dello studio di tesi sono stati i seguenti:

1. *Selezione di polimorfismi nei geni d'interesse attraverso l'analisi della letteratura scientifica e l'utilizzo di tools bioinformatici;*
2. *Messa a punto delle metodiche analitiche per la caratterizzazione dei polimorfismi genici;*
3. *Individuazione di marcatori farmacogenetici di tossicità alla terapia con FOLFIRI*
4. *Individuazione di marcatori farmacogenetici di risposta alla terapia con FOLFIRI*
5. *Individuazione di marcatori genici modulanti aspetti farmacocinetici*

In particolare, i suddetti obiettivi sono stati sviluppati nell'ambito del lavoro di tesi come segue:

- I. Selezione di geni candidati per l'analisi farmacogenetica con potenziale rilevanza nel modulare l'esito clinico di una terapia con irinotecano (regime FOLFIRI) nel carcinoma del colon retto metastatico sulla base di evidenze riportate in letteratura. Questi i pathways e i relativi geni individuati:
 - a. metabolismo ossidativo (CYP3A4, CYP3A5)
 - b. inattivazione e detossificazione (UGT1A1, UGT1A7, UGT1A9)

-
- c. escrezione ed uptake del farmaco e dei suoi metaboliti (ABCB1, ABCC1, ABCC2, ABCG2, SLCO1B1)
- II. Selezione in silico di polimorfismi nei geni candidati selezionati sulla base di:
 - a. evidenze di correlazione genotipo- fenotipo;
 - b. possibile impatto clinico;
 - c. frequenza allelica relativamente elevata nella nostra popolazione caucasica.
 - III. Messa a punto di nuove metodiche analitiche di biologia molecolare per la determinazione dei polimorfismi genetici selezionati (in tutto un pool di 50 markers).
 - IV. Caratterizzazione genotipica di un gruppo di 250 con CCR metastatico omogeneamente trattati con regime FOLFIRI.
 - V. Analisi delle possibili relazioni di Linkage Disequilibrium (LD) tra polimorfismi e determinazione statistica dei più comuni aplotipi.
 - VI. Elaborazione statistica dei dati ottenuti al fine di valutare il ruolo dei marcatori genici e aplotipici nell'influenzare i seguenti aspetti della terapia:
 - sviluppo di tossicità ematologica e non ematologica, sia durante il primo ciclo di chemioterapia (tossicità acuta) che durante l'intero corso del trattamento (tossicità cumulativa), con particolare attenzione alla neutropenia e alla diarrea.
 - grado di risposta tumorale in termini di clinical benefit e response rate.
 - tempo alla progressione tumorale e sopravvivenza
 - profilo farmacocinetico dell'irinotecano e dei suoi metaboliti principali (SN-38 e SN-38G)

La raccolta dei dati clinici e farmacocinetici è stata precedentemente portata a termine presso i centri coinvolti nello studio e presso il laboratorio di farmacocinetica della Struttura Operativa Complessa di Farmacologia Sperimentale e Clinica del CRO di Aviano.

3. MATERIALI E METODI

3.1 ARRUOLAMENTO DEI PAZIENTI, SOMMINISTRAZIONE DELLA CHEMIOTERAPIA E VALUTAZIONI CLINICHE

Lo studio, di tipo retrospettivo, esposto nella tesi, è stato condotto su campioni di sangue periferico raccolti prospetticamente tra luglio 2002 ed ottobre 2005 da soggetti con CCR metastatico. Tutti i pazienti, arruolati in 13 diversi centri del Nord-Est Italia sotto la coordinazione del Centro di Riferimento Oncologico (C.R.O) di Aviano, un Istituto di Ricovero e di Cura a Carattere Scientifico, hanno dato il consenso informato per l'analisi genetica usando l'opportuno modulo approvato dal Comitato Etico locale. I casi eleggibili per questo studio sono costituiti da individui con diagnosi di adenocarcinoma colon rettale metastatico istologicamente confermato, di età compresa fra i 18 e i 75 anni e di etnia caucasica. Inoltre non devono aver ricevuto precedentemente una chemioterapia per la malattia metastatica comprendente irinotecano, devono presentare metastasi non resecabili, conta neutrofila assoluta (ANC) $\geq 2000/\mu\text{l}$, piastrine $\geq 100000/\mu\text{l}$, performance status (WHO): 0-2, aspettativa di vita > 3 mesi, almeno una lesione cancerosa misurabile, funzione renale normale (Creatinina Clearance > 65 ml/min by Cockcroft [226]) e valori normali di transaminasi epatiche (AST, ALT $< 1.25x$ come valore normale o $< 2x$ in caso di Sindrome di Gilbert). Tutti i soggetti sono stati classificati seguendo i parametri istopatologici convenzionali ovvero il sito primario del tumore, il sito metastatico ed il numero di metastasi, lo stadio (TNM), l'eventuale asportazione chirurgica del tumore primario e l'eventuale somministrazione di chemioterapia o radioterapia adiuvante.

I pazienti sono stati trattati, come terapia di prima linea, con regime FOLFIRI modificato ($> 90\%$ dei pazienti), così come descritto da Tournigand [227] (CPT-11 $180 \text{ mg}/\text{m}^2$ 2 ore di infusione, giorno 1 + 5-FU $400 \text{ mg}/\text{m}^2$ in bolo seguito da $2400 \text{ mg}/\text{m}^2$ 46 ore di infusione continua + LV $200 \text{ mg}/\text{m}^2$, giorno 1 ogni 2 settimane), oppure con regime FOLFIRI [81] (CPT-11 $180 \text{ mg}/\text{m}^2$ 2 ore di infusione, giorno 1 + 5-FU $400 \text{ mg}/\text{m}^2$ in bolo seguiti da $600 \text{ mg}/\text{m}^2$ 22 ore di infusione continua, giorni 1 e 2 + LV $200 \text{ mg}/\text{m}^2$, giorno 1 e 2 ogni 2 settimane). Un ciclo di trattamento corrisponde a due settimane di terapia. Prima di iniziare la somministrazione di irinotecano, i pazienti sono stati trattati con atropina 0.5 mg, dexamethasone 8 mg e granisetron 3 mg o ondansetron 8 mg; eventi di diarrea sono stati trattati prontamente con loperamide 4mg al momento dell'insorgenza e poi con 2 mg ogni 2 ore fino ad esaurimento della sintomatologia.

Per la valutazione clinica della tossicità, ad ogni ciclo di chemioterapia, i pazienti sono stati interrogati sull'eventuale presenza di manifestazioni quali nausea, vomito, mucosite, diarrea, senso di malessere generale ed alterazioni dell'appetito. Inoltre, entro le 48 ore prima di ogni ciclo, è stata eseguita una valutazione clinica obiettiva, è stato effettuato un test ematochimico con conteggio delle cellule ematiche e sono state testate la funzionalità epatica e renale. L'indagine tramite Tomografia Computerizzata (TC), impiegata per la determinazione e valutazione delle lesioni misurabile, è stata effettuata al momento dell'inserimento nello studio, ottenendo così i valori basali di riferimento, ed è stata poi ripetuta ogni quattro cicli di terapia in modo da monitorare la risposta al trattamento. Una singola somministrazione della chemioterapia è stata considerata sufficiente per valutare la tossicità acuta mentre la risposta al trattamento è stata calcolata solo per i pazienti che hanno ricevuto almeno quattro cicli di terapia. I dati di tossicità, registrati ad ogni ciclo di terapia, sono stati classificati secondo la scala NCI-CTC (National Cancer Institute-Common Toxicity Criteria). E' stato considerato il grado massimo di tossicità sviluppato sia durante il primo ciclo di terapia (tossicità acuta) che durante l'intero corso del trattamento (tossicità cumulativa). Infine l'elaborazione dei dati è stata eseguita raggruppando fra loro le reazioni avverse di tipo ematologico e non ematologico. In caso di ANC $\leq 1500\mu\text{l}$ o di tossicità non ematologica severa e persistente, la chemioterapia è stata rimandata fino al recupero del paziente. In caso di neutropenia, trombocitopenia e diarrea di grado 3 o 4, la dose di irinotecano è stata ridotta (da 180 mg/m^2) a 90 o 150 mg/m^2 in base alla valutazione del clinico. Il trattamento è stato sospeso in caso di eventi ripetuti di tossicità severa (grado 3 o 4) nonostante la riduzione di dose oppure in caso di rifiuto del paziente. I dati sulla risposta alla terapia e sulla sua durata sono stati valutati secondo i criteri WHO. I pazienti con malattia in progressione sono stati dimessi dallo studio oppure hanno continuato la chemioterapia per altri due cicli aggiuntivi in base alla decisione del clinico.

3.2 CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

I campioni di sangue intero eparinizzato, prelevato dai pazienti, sono stati stoccati e conservati in freezer a -80°C per gli studi di farmacogenetica. Il plasma, utilizzato per le indagini farmacocinetiche, è stato immediatamente separato dal sangue intero per centrifugazione ($3000 \times g$ per 15') ed anch'esso è stato conservato in freezer a -80°C . Una temperatura molto inferiore ai -20°C è necessaria, infatti, per bloccare le attività enzimatiche ed evitare la denaturazione delle proteine indispensabili per la valutazione farmacocinetica. Infine tutti i dati personali e clinici sono stati inseriti in appositi database, redatti in conformità alla normativa sulla privacy.

3.3 ESTRAZIONE DI DNA GENOMICO DA SANGUE INTERO

L'estrazione del DNA genomico da sangue intero è stata eseguita con metodica automatizzata attraverso l'impiego del BioRobot[®] EZ1 (Qiagen s.p.a., Milano, Italia). Questo strumento è dotato di una serie di cards che permettono di selezionare diversi programmi di estrazione in base al tipo di campioni di cui si dispone per ricavare il DNA o RNA: sangue, tessuti crioconservati o paraffinati, paraffina, cellule di coltura ecc. In questo caso è stata utilizzata la Card "EZ1 DNA Blood", in associazione al Kit "EZ1 DNA Blood 200 μl Kit", della ditta QUIAGEN[®], per l'estrazione di DNA genomico a partire da 200 μl di sangue intero ottenendo 200 μl finali (corrispondente a circa 4-8 μg di DNA). Una volta inserita la card appropriata ed avviato il programma, con il BioRobot vengono processati 6 campioni contemporaneamente, senza alcun intervento da parte dell'operatore. Tutti i reagenti necessari per l'estrazione (sfere magnetiche, buffer di lisi, buffer di lavaggio e buffer di eluizione) sono contenuti in un'unica cartuccia, presente nel Kit, composta da pozzetti allineati che vengono inseriti nell'apposito supporto.

Il principio su cui si basa questo tipo di estrazione è il legame del filamento di DNA alle particelle magnetiche rivestite di silice in presenza di sale caotropico. In tal modo il DNA viene trattenuto e purificato dal campione di sangue.

Il Kit contiene:

- 40 cartucce di reagenti per 200 μl di sangue (biglie magnetiche, buffer di lisi, buffer di lavaggio e buffer di eluizione);
- 50 supporti per puntali;

- 50 puntali con filtro;
- 50 provette per i campioni da 2 ml;
- 50 provette per l'eluato da 1,5 ml.

La procedura prevede schematicamente la seguente serie di passaggi:

1. Inserimento della card (EZ1 DNA Blood) nell'apposita fessura, a strumento spento, e accensione del BioRobot® EZ1.
2. Inserimento dei vari componenti del Kit, in quantità corrispondente al numero di campioni da estrarre e nelle posizioni idonee man mano indicate sul monitor dell'estrattore. In particolare si collocano le cartucce contenenti i reagenti, le provette per la raccolta dell'eluato contenente il DNA purificato, i puntali per lo strumento e le provette contenenti i 200µl di sangue intero per l'estrazione del campione.
3. Attivazione della procedura di estrazione i cui steps si susseguono in maniera automatizzata: (A) lisi delle cellule linfocitarie (grazie al buffer contenente la Proteinasi K) (B) aggiunta di beads magnetiche rivestite di silice che legano il DNA sulla loro superficie in presenza di sali (C) legame del DNA alle beads mediante mescolamento della soluzione che favorisce il contatto dei filamenti di DNA con la silice (D) eliminazione del lisato in eccesso attraverso una separazione magnetica che permette di trattenere nei puntali le particelle leganti il DNA (D) lavaggio delle beads con Washing Buffer e successiva eliminazione del liquido di lavaggio mediante separazione magnetica (E) aggiunta di Elution Buffer ed eluizione dei 200µl di DNA previsti nelle apposite provette posizionate nel supporto. Il risultato è un DNA purificato e di alta qualità, ottenuto in modo semplice (automatizzato) e rapido (20 minuti invece di 2 ore circa necessarie per il metodo manuale).

Il DNA estratto e purificato viene mantenuto ad una temperatura di + 2-8°C.

3.4 POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

La tecnica della reazione a catena della DNA polimerasi (PCR) è stata inventata nel 1983 da K.Mullis e permette di produrre in vitro un numero elevato di copie di una specifica sequenza di DNA. Questa metodica è diventata subito uno strumento basilare per la biologia molecolare grazie alla sua enorme versatilità per la manipolazione ed analisi del DNA. Inoltre tale metodica è alla base di molteplici tecniche che sono state sviluppate negli ultimi anni per analizzare i polimorfismi genetici (Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), analisi dei frammenti al sequenziatore, Pyrosequencing e metodo TaqMan).

La PCR utilizza gli stessi elementi di base del naturale processo di replicazione. In vivo, il doppio filamento di DNA viene inizialmente srotolato e aperto da specifici enzimi in modo tale che ogni filamento parentale possa poi essere usato dalla DNA polimerasi come stampo (templato) per produrre un filamento complementare. Questo processo di polimerizzazione si basa sulla capacità dei nucleotidi di appaiarsi in modo specifico secondo le regole di Watson e Crick: l'adenina s'appaia sempre con la timina e la guanina sempre con la citosina. Nel processo in vitro, il DNA viene inizialmente riscaldato a temperature vicine a quella di ebollizione, in modo tale da denaturarlo e ottenere così lo stampo a singolo filamento; viene poi utilizzata la Taq polimerasi che catalizza la duplicazione del filamento parentale. Questo enzima, per avviare la reazione di sintesi, necessita di un innesco rappresentato da una piccola sequenza di DNA a doppio filamento. Tale innesco, nella PCR, viene fornito da un oligonucleotide sintetico, il primer, che s'appaia alla sequenza complementare di DNA da cui si vuole partire per effettuare l'amplificazione. Nella provetta di reazione si aggiungono, quindi, due primers, uno per permettere la sintesi del filamento senso (primer senso o forward) e uno per la sintesi di quello antisenso (primer antisenso o reverse). I due primers delimitano la regione target da amplificare.

La PCR richiede diversi reagenti e condizioni di reazione che variano nel tempo.

In particolare, i campioni vengono sottoposti ad una serie di cicli termici schematizzati di seguito:

- Un periodo iniziale a temperatura elevata (94-95°C) che permette la prima massiccia denaturazione del DNA di partenza, allo scopo di separare completamente i filamenti del templato che fungono da stampo.
- Un numero variabile di cicli di amplificazione consecutivi, ognuno dei quali è costituito da tre fasi a cui corrispondono tre temperature diverse:

1. Denaturazione completa del DNA, effettuata sempre tramite riscaldamento a elevate temperature (94-95°C).
2. Appaiamento (annealing) dei primers senso e antisenso con le sequenze complementari sul DNA stampo. In questa fase la temperatura viene abbassata a valori che possono variare da 50°C a 65°C in base alle caratteristiche peculiari dei primers utilizzati.
3. Estensione (elongation) dei primers e sintesi dei nuovi filamenti da parte della Taq polimerasi, ad una temperatura di 72°C ottimale per l'attività dell'enzima.

Per ottenere l'amplificazione della sequenza desiderata di DNA in quantità adeguate, tale ciclo di tre fasi deve essere ripetuto diverse volte, in genere dalle 20 alle 40 volte.

- Un periodo finale a 72°C per portare a completamento la reazione di estensione.

Questa serie di cicli termici viene effettuata grazie ad uno strumento programmabile, il termociclatore, capace di cambiare la temperatura molto velocemente e di mantenerla costante per un determinato periodo di tempo.

Il risultato netto di una PCR è che, al termine di n cicli di amplificazione, la miscela di reazione contiene un numero massimo teorico di DNA a doppia elica pari a 2^n (dove "n" rappresenta il numero di cicli di amplificazione). In realtà, nell'esecuzione pratica, poiché la PCR non agisce mai con una efficienza del 100%, la zona di DNA interessata viene in media amplificata di 10^5 volte.

Il meccanismo di funzionamento della reazione a catena della DNA polimerasi è molto semplice. Nel primo ciclo di PCR i due primers si appaiano con i due filamenti del templatato denaturato, fornendo così l'innescò per la polimerasi che sintetizza i filamenti complementari; al termine di questo ciclo, oltre ai filamenti di templatato originari, si hanno due nuovi filamenti che sono più lunghi della regione da amplificare e che hanno le parti terminali corrispondenti alla sequenza dei primers usati per individuare la sequenza bersaglio. Nel secondo ciclo i primers si appaiano nuovamente al templatato originario ma anche ai nuovi filamenti; dal templatato originario si producono altri neofilamenti di lunghezza indefinita, mentre nei filamenti sintetizzati nel primo ciclo l'enzima non trova più DNA una volta raggiunta la fine dei primers. Quindi nei successivi cicli si formano poi solo frammenti della lunghezza desiderata e che contengono la regione specifica che si vuole amplificare (Figura 3.1).

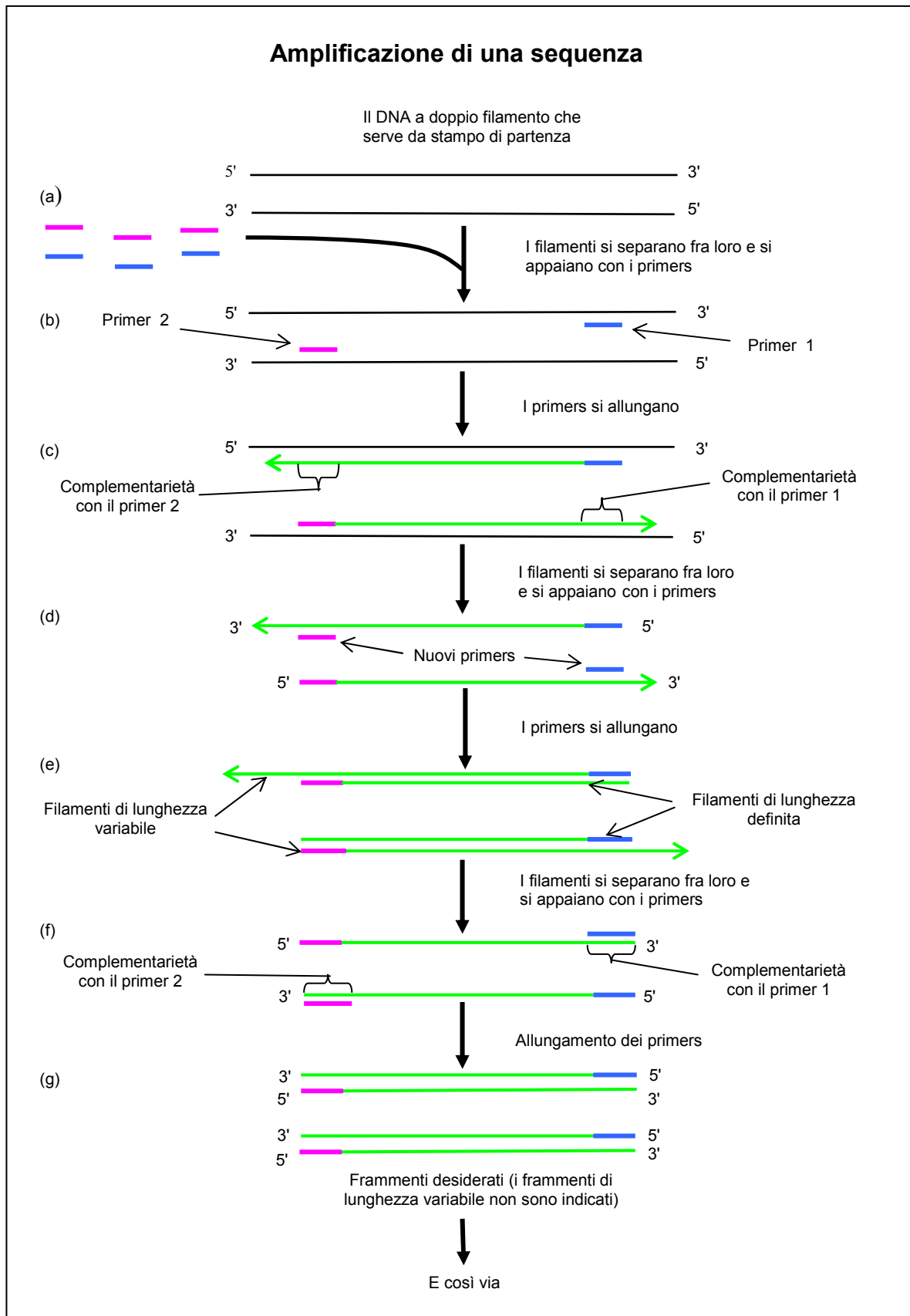


Figura 3.1: Schema della reazione a catena della polimerasi (PCR)

Il materiale di partenza della PCR è il DNA genomico che contiene la sequenza che deve essere amplificata; non è necessario isolare tale sequenza poiché viene direttamente individuata dai due specifici primers usati nella reazione.

I reagenti usati in una PCR sono: il tampone di reazione, gli ioni magnesio forniti dal cloruro di magnesio ($MgCl_2$), i deossinucleotiditri-fosfato (dNTPs), i primers, la DNA polimerasi ed il template. In particolare, per ogni campione, viene fatta prima una miscela di reazione, contenente il tampone di reazione, una soluzione di $MgCl_2$, i dNTPs, i primers e la DNA polimerasi, e a questa viene poi infine aggiunto il DNA genomico.

1) Il tampone di reazione è un tampone a base di Tris-HCl e KCl e serve per riprodurre le condizioni ottimali per l'attività della polimerasi aumentandone così la processività ovvero il numero di nucleotidi che l'enzima riesce ad inserire di seguito prima di distaccarsi dal filamento stampo.

2) Lo ione magnesio è un altro elemento fondamentale per l'attività della Taq polimerasi in quanto il suo legame con l'enzima lo stabilizza in una conformazione tridimensionale tale da favorirne l'attività. La Taq polimerasi mostra la sua più alta attività intorno ad una concentrazione di magnesio libero pari a 1,2-1,3mM. La concentrazione di magnesio libero è tuttavia influenzata dalla concentrazione dei nucleotidi in quanto esiste un legame equimolare tra magnesio e dNTPs. Si possono poi utilizzare anche concentrazioni di magnesio maggiori di quelle indicate sopra, ma bisogna tenere in considerazione che ad elevate concentrazioni di magnesio la polimerasi tende ad incorporare nucleotidi sbagliati. Per ovviare a questo problema vengono utilizzati dei buffer privi di magnesio in modo tale da poter stabilire di volta in volta, facendo una serie di prove, quale è in quel caso la concentrazione di magnesio ottimale per assicurare specificità ed efficienza alla reazione.

3) Le soluzioni dei dNTPs contengono le quattro basi azotate del DNA: dATP, dGTP, dTTP e dCTP. Per una buona efficienza della PCR i 4 nucleotidi devono essere presenti in concentrazioni equimolari e la concentrazione ottimale è intorno ai 50-200 μ M. Una concentrazione troppo elevata può aumentare il tasso errato di incorporazione, mentre una concentrazione troppo bassa può danneggiare l'efficienza della reazione.

4) Nella maggior parte delle PCR vengono usati due primers (senso o forward e antisenso o reverse) di sequenza diversa che s'appaiano con i filamenti complementari del template. Se la sequenza del template è conosciuta risulta allora piuttosto semplice disegnare dei primers adatti per l'amplificazione della regione d'interesse. Per la scelta dei primers devono essere seguite delle regole basilari:

- La lunghezza dei primers deve essere di circa 20-30 nucleotidi in modo tale da garantire una buona specificità per la sequenza target.
- I primers devono avere una distribuzione bilanciata dei domini ricchi di GC e AT.
- Evitare sequenze ripetute o file di uno stesso nucleotide per evitare che il primer slitti sul template.
- Evitare zone ricche di CG al 3' che possono portare ad un appaiamento scorretto.
- Evitare sequenze palindromiche e autocomplementari all'interno del primer.
- Evitare sequenze complementari con l'altro primer in modo tale che non si formino dimeri primer-primer
- La temperatura di melting (T_m) di un primer descrive la temperatura alla quale metà dei primer sono appaiati alla sequenza target. [$T_m = 2^\circ\text{C} \times (A+T) + 4^\circ\text{C} \times (G+C)$]. Le temperature di melting dei due primers impiegati devono essere molto vicine tra loro con una differenza massima di 2°C . Le T_m vanno di solito dai 55°C ai 68°C .

Il disegno dei primers può essere effettuato manualmente oppure più frequentemente tramite l'impiego di alcuni programmi che ne facilitano la scelta come ad esempio "primer3_www.cgi, versione 0.2", disponibile gratuitamente on-line.

I primers vengono generalmente usati in una quantità equimolare e la concentrazione ottimale va da $0,1\mu\text{M}$ a $0,5\mu\text{M}$. Una concentrazione di primers troppo elevata può favorire il mispriming e l'accumulo di prodotti non specifici, mentre una concentrazione troppo bassa può non consentire il completamento di tutti i cicli previsti con una diminuzione del prodotto finale desiderato.

5) La DNA polimerasi utilizzata proviene dal batterio *Thermophilus aquaticus*, è stabile ad alte temperature e lavora con massima efficienza tra i 72°C - 75°C . La termostabilità è una caratteristica fondamentale di questo enzima visto che la PCR presenta numerosi cicli e fasi a temperature diverse ed elevate. La Taq polimerasi a 72°C possiede una attività enzimatica che permette l'incorporazione di 50-60 nucleotidi al secondo che corrispondono a circa 3Kb al minuto. La concentrazione ottimale di Taq DNA polimerasi va dalle 0,5U alle 2,5U. Una concentrazione troppo elevata può diminuire la specificità della reazione, mentre una concentrazione troppo bassa può non permettere la conclusione di tutti i cicli.

6) Generalmente, partendo da DNA genomico, si utilizza per PCR 0,1-1 μg di template di cui è fondamentale la purezza. Per la specificità della reazione è basilare il rapporto (primer)/(template). Se la quantità di template è troppo bassa i primers possono non trovare

la sequenza complementare, se, invece, la quantità è troppo elevata possono aumentare gli eventi di mispriming.

Uno dei principali problemi che possono interferire con la riuscita ottimale del processo, sono le contaminazioni con DNA diverso da quello che si vuole amplificare. Infatti, vista l'elevata efficienza della PCR, è possibile che vengano amplificate anche piccole quantità di DNA diverso da quello usato come template. Le sorgenti principali di contaminazione possono essere: le superfici di lavoro, gli strumenti utilizzati, ma anche la presenza di sostanze contaminanti nei reagenti o la presenza di amplificati provenienti da altre PCR. Per evitare questo, si adibisce una zona particolare del laboratorio solo alle reazioni di PCR, facendo attenzione a non portare in questa zona materiale amplificato. Inoltre si usano puntali con filtro e si lavano frequentemente le pipette e le superfici di lavoro con etanolo o acido cloridrico diluito. Infine, ad ogni esperimento, allo scopo di verificare eventuali contaminazioni, viene introdotto anche un controllo negativo, costituito dalla sola miscela di reazione senza l'aggiunta del DNA genomico.

3.4.1 OTTIMIZZAZIONE DELLE CONDIZIONI DI PCR

I tre parametri fondamentali per ottenere buoni risultati nel processo di PCR sono: l'efficienza (o resa), la specificità di reazione e l'accuratezza. Perché una PCR abbia una elevata efficienza, si deve ottenere un numero elevato di prodotti con il minor numero di cicli possibile. La specificità della reazione viene intesa come la capacità di amplificare solo la sequenza d'interesse, senza ottenere prodotti aspecifici. Infine, una alta accuratezza è data dalla presenza di un numero trascurabile di errori indotti dalla DNA polimerasi.

Una volta disegnati i primers in modo opportuno, ci sono delle condizioni che, se modificate in modo adeguato, possono migliorare questi parametri e sono: la concentrazione di utilizzo del magnesio, le temperature di denaturazione e di appaiamento, il numero di cicli di amplificazione di PCR e l'uso di sostanze additive.

1) La concentrazione degli ioni magnesio è uno dei parametri fondamentali della PCR in quanto influenza la specificità e l'efficienza della reazione. La Taq polimerasi per funzionare in modo corretto necessita di una precisa concentrazione di questo ione. Se la concentrazione di magnesio è troppo bassa è facile avere poco prodotto di PCR, mentre un eccesso comporta una perdita di fedeltà della Taq e anche l'amplificazione di prodotti non specifici. La presenza di oligonucleotidi (primers) di sequenza e lunghezza diversa caso per caso e la presenza di deossinucleotidi in soluzione, ricchi di gruppi fosfato carichi negativamente, può

sottrarre magnesio libero all'ambiente di reazione. E' necessario, quindi, mettere a punto empiricamente di volta in volta la concentrazione di magnesio più adatta in quel caso in base alla quantità di dNTPs e primers presenti. Generalmente si eseguono più prove facendo variare la concentrazione di magnesio in un intervallo da 0,5mM a 5mM in modo da scegliere poi il valore ottimale.

2) La temperatura impiegata durante la fase di appaiamento dei primers con la sequenza specifica di DNA, viene chiamata temperatura di annealing (T_a) ed è un fattore molto importante in quanto permette di modulare il processo in modo tale che sia il più specifico possibile. La temperatura di annealing può andare da 50°C a 65°C in base alla temperatura di melting dei primers utilizzati (generalmente $T_a = T_m - 2^\circ\text{C}$) e, per ottenere buoni risultati, si cerca comunque di alzarla il più possibile. Dato però che l'aumento della temperatura, oltre ad un incremento della specificità, può portare anche ad una diminuzione della resa, è necessario determinare sperimentalmente di volta in volta le condizioni di reazione adeguate per ottenere una amplificazione ottimale. Di solito si comincia provando una temperatura di annealing attorno ai 60°C e poi eventualmente si modifica in base al risultato ottenuto.

Inoltre, anche la denaturazione del DNA deve avvenire in modo efficiente e completo e questo dipende dalla temperatura impiegata in questa fase: per regioni ricche di G-C si consigliano temperature più alte.

3) Dal numero di cicli dipende la resa della PCR: maggiore è il numero di cicli e maggiore sarà la quantità di DNA prodotta. Se però il numero di cicli è troppo alto, si rischia di aumentare il tasso di incorporazione di errori e di ottenere sottoprodotti derivati da un appaiamento aspecifico dei primers. Il numero di cicli ottimale, quindi, deve essere settato caso per caso e in genere oscilla tra i 20 e i 40, anche perché la Taq, a condizioni standard, può sopportare al massimo 50 cicli.

4) Esistono, infine, degli additivi che possono essere aggiunti alla miscela di reazione della PCR per aumentare la specificità di appaiamento dei primer o la quantità di prodotto amplificato. Sono sostanze denaturanti che portano ad una destabilizzazione dell'appaiamento tra le basi e, di conseguenza, anche ad una elevata destabilizzazione dei complessi primer/DNA di tipo aspecifico. Le sostanze utilizzate possono essere: DMSO (dimetilsolfossido) fino al 10%, formammide fino al 5% e glicerolo fino al 10-15%.

Esistono metodiche particolari per aumentare la specificità della reazione di PCR, ad esempio la Touchdown, la Hot-start e la Nested PCR. Fra queste, la tecnica più efficiente in termini di amplificazione del frammento specifico è la Nested PCR (Fig 3.2).

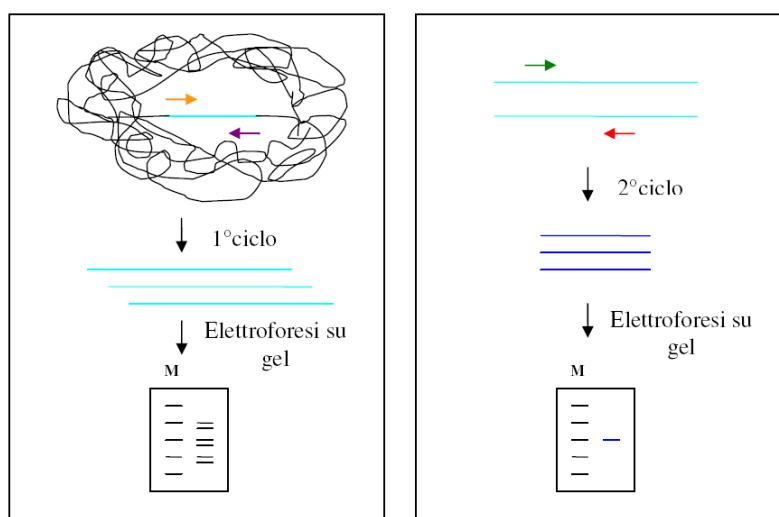


Figura 3.2 Schema della Nested PCR

Questa tecnica consiste nell'esecuzione di due PCR. Nella prima il campione è amplificato per 20-30 cicli, usando un set di primers che delimitano una sequenza più ampia di quella desiderata. Poi una piccola aliquota viene amplificata una seconda volta, per 15-25 cicli, con un set di primers disegnato all'interno della sequenza target desiderata. La posizione di questi primers interni è un fattore determinante per la riuscita della reazione e per le dimensioni del prodotto finale, che di solito è piccolo: 120-270 bp. Nella selezione del set di primers per la nested PCR, bisogna far attenzione ad eliminare potenziali dimeri di primers e legami tra membri del set di primers interni ed esterni.

I reagenti e le soluzioni impiegate nella preparazione della miscela di reazione della PCR sono:

- Aqua B. Braun Ecotainer, acqua sterile per preparazioni iniettabili, confezione da 1000 ml (B. Braun, Melsungen AG, Germany)
- dNTP set (dATP dCTP, dGTP, dTTP, 25µmol ciascuno) fornito dalla ditta Promega (Madison, WI, USA)
- Dimethyl sulfoxide (DMSO) sterile e apirogeno in soluzione criopreservata, confezione da 70 ml (Research Industries Corporation, Pharmacological Division, Utah, USA).
- Primer senso (o forward) e antisenso (o reverse) forniti in forma liofilizzata (Sigma Genosys, Cambridge, UK) e risospesi poi in acqua sterile in modo da ottenere una concentrazione finale di 1000mM.
- Kit Ampli Taq Gold[®] (Applied Biosystems, CA, USA) costituito da:

- 10X PCR Gold Buffer, privo di $MgCl_2$.
- $MgCl_2$ Solution 25mM.
- Ampli Taq GoldTM 5U/ μ l.
- Kit fornito dalla ditta Polymed (FI, Italia) costituito da:
 - Reaction Buffer 10X, privo di $MgCl_2$.
 - $MgCl_2$ 50mM.
 - Polytaq 5U/ μ L.
- Kit fornito dalla ditta Promega (Madison, WI, USA) costituito da.:
 - 5X Buffer, privo di $MgCl_2$.
 - $MgCl_2$ 25mM.
 - GoTaq® Flexi DNA Polymerase Taq DNA Polymerase 5U/ μ l.

Nel procedimento di PCR si sono utilizzati anche:

- Marker di pesi molecolari PhiX174DNA/HaeIII (1 μ g/ μ l) (Promega, Madison, WI, USA).
- Software per primer design, primer3_www.cgi, versione 0.2, disponibile gratuitamente on-line.

L'esecuzione dei cicli previsti dalla PCR è stata effettuata utilizzando il Termociclatore Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany). In alcuni casi è stato impiegato il Robot BIOMEK[®] 3000 - Laboratory Automation Workstation (Beckman Coulter, Inc, Brea, CA, USA) per le operazioni di assemblaggio delle reazione PCR, che permette di processare i campioni in modo automatizzato con una netta riduzione della tempistica.

Si sono impiegati inoltre provette, pipette e puntali (Gilson, Middleton, WI, USA, Eppendorf, Hamburg, Germany).

3.5 ELETTROFORESI SU GEL D'AGAROSIO

Per verificare che il processo di amplificazione abbia avuto successo, si prosegue con una corsa elettroforetica su gel d'agarosio che permette di separare i frammenti di DNA solo in base al loro peso molecolare, presentando questi un uguale densità di carica elettrica negativa. L'elettroforesi si basa sul principio che, in presenza di un campo elettrico applicato al tampone in cui è immerso il gel, il DNA carico negativamente tende a migrare verso il polo positivo spostandosi lungo le maglie del gel. La velocità di migrazione è inversamente proporzionale al peso molecolare del DNA e alla concentrazione del gel.

Il calibro dei pori del gel è determinato dalla concentrazione dell'agarosio, per cui si possono realizzare gel molto densi per risolvere frammenti di DNA molto piccoli, o gel molto lassi per separare DNA di grandi dimensioni. Per la verifica della PCR viene utilizzato un gel di agarosio al 3% in tampone TAE (tris-acetato-EDTA). Il gel viene preparato riscaldando la miscela fino al punto di fusione dell'agarosio e facendo poi raffreddare la stessa a temperatura ambiente in modo tale che solidifichi allo stato di gel. Alla miscela fusa del gel, prima del raffreddamento, viene aggiunto, in concentrazione 0,05mg/ml, l'etidio bromuro, un intercalante che lega il DNA a doppio filamento e permette al complesso di assorbire i raggi U.V. riemettendo nel campo del visibile. La miscela fusa viene fatta raffreddare in un apposito stampo rettangolare in cui viene inserito un pettinino per creare i pozzetti di caricamento.

Alla soluzione contenente i frammenti di DNA da separare, viene aggiunto il Loading Buffer composto da glicerolo, blu di bromofenolo, SDS ed EDTA. Il glicerolo serve per creare un ambiente in cui il DNA precipita, permettendo così il caricamento del campione nel pozzetto formato nel gel, mentre il blu di bromofenolo si mescola al campione e, migrando verso il polo positivo come il DNA, permette di seguire l'andamento della corsa. L' SDS è un detergente anionico e l'EDTA serve a potare la soluzione al giusto pH.

Una volta che il gel è solidificato, viene tolto il pettinino, e il gel viene posizionato nella cameretta elettroforetica riempita con tampone TAE. I campioni vengono poi caricati, e la corsa elettroforetica viene fatta partire ad un voltaggio di circa 100V. Durante la corsa i frammenti omogenei per peso molecolare si separano formando delle bande elettroforetiche che, grazie all'impiego dell'etidio bromuro, possono essere poi visualizzate tramite uno strumento, il transilluminatore, che illumina il gel con luce ultravioletta. Infine, l'immagine del gel può essere acquisita usando il software Kodak 1D LE 3.6.

Per la preparazione del gel d'agarosio si sono utilizzati:

- Agarose, confezione da 500gr (Sigma-Aldrich, MO, USA).
- Tampone TAE 1X formato da: TRIS 40mM, Na-Acetato 5mM e EDTA 1mM; il tampone è stato poi portato a pH di 7,5-8 con l'aggiunta di acido acetico glaciale. Tutti i reagenti sono stati forniti dalla ditta Carlo Erba Reagenti (MI, Italia).
- Etidio bromuro (Carlo Erba Reagenti, MI, Italia).

Per il caricamento dei campioni si è impiegato il Loading Buffer 10X costituito da:

- 50% Glicerolo (Carlo Erba Reagenti, MI, Italia).
- 0,1% Blu di bromofenolo (BIO-RAD Laboratories, CA, USA).
- 1% sodiododecilsolfato (SDS) (ICN Biomedicals, Ohio, USA).
- 1000mM acido etilendiaminotetracetico (EDTA) (ICN Biomedicals, Ohio, USA).

Gli strumenti che si sono utilizzati per l'elettroforesi su gel d'agarosio sono:

- Cella per elettroforesi BIO-RAD (BIO-RAD Laboratories, CA, USA).
- Alimentatore CONSORT E815 (Consort nv, Turnhout, Belgium)
- Transilluminatore Kodak EDAS 290 dotato del software Kodak 1D LE 3.6 per la gestione delle immagini (Eastman Kodak Company, NY, USA)

3.6 METODICHE PER L'ANALISI DI POLIMORFISMI

Grazie ai recenti sviluppi della genetica molecolare, attualmente esistono diverse tecniche che permettono di individuare alterazioni geniche note esaminando direttamente sul DNA le differenze nella sequenza nucleotidica. In particolare, nel lavoro di questa tesi, sono state impiegate metodiche di genotipizzazione semiautomatizzate di recente sviluppo, basate sulla reazione di PCR, che permettono di identificare polimorfismi genici in maniera molto semplice e veloce: l'**Analisi dei Frammenti (Gene Scan)**, la tecnologia del **Pyrosequencing (PSQ)** e la metodologia di discriminazione allelica basata sulla chimica **TaqMan**.

3.6.1 ANALISI DEI FRAMMENTI

L'analisi automatizzata dei frammenti permette di separare frammenti di DNA, sulla base delle dimensioni, tramite una corsa elettroforetica capillare accoppiata ad un'analisi di fluorescenza.

Una tecnica di separazione e determinazione deve presentare i seguenti requisiti:

- Metodi per realizzare misurazioni su un intervallo di dimensioni di 75-500 bp;
- Elevata precisione tra i campioni delle varie corse;
- Effettiva separazione dei colori di differenti set per evitare mescolamenti;
- Risoluzione di 1 bp al minimo fino ad approssimati 350 bp.

La buona riuscita di una corsa elettroforetica dipende da numerosi fattori [228]:

- Il Capillare: nell'elettroforesi capillare la separazione si effettua tramite un tubicino con diametro interno di 50-100 μ m. Tale sottigliezza permette l'applicazione di un campo elettrico elevato e quindi riduce i tempi di corsa senza problemi di surriscaldamento associati all'elevato voltaggio usato. Se il capillare non è ricoperto, cariche residue sulla superficie silicea inducono un flusso della soluzione di bulk attraverso l'elettrodo negativo. Questo processo, conosciuto come flusso elettrosmotico, crea problemi nella riproducibilità della separazione del DNA in quanto la velocità dei frammenti può cambiare da corsa a corsa. Per evitare ciò, si modifica chimicamente (con gruppi silanolici carichi) o si ricopre dinamicamente il capillare.
- Il Polimero: ci sono molte differenti tipologie di mezzi di setacciamento utilizzati nelle separazioni elettroforetiche che dipendono dalle rispettive caratteristiche fisiche. Ad esempio si possono impiegare i gel fisici, prodotti dall'agarosio,

oppure i comuni gel chimici, come quello di poliacrilammide usato in lastre di gel elettroforetici denaturanti, che sono materiali rigidi cross-linkati in cui la struttura porosa è tenuta legata tramite legami covalenti. Questi due materiali sono però problematici da usare all'interno di un capillare per la formazione, ad esempio, di bolle d'aria, sia durante il rivestimento del lume che nella fase di contrazione del gel, a causa della polimerizzazione. Il terzo tipo di materiali setaccianti sono polimeri aggrovigliati caratterizzati anche da interazioni intermolecolari. Questi (ad esempio la poliacrilammide lineare cioè non cross-linkata) hanno sostituito gli altri due tipi di gel in quanto sono meno problematici.

- la Formammide: è molto importante utilizzare formammide di alta qualità e con bassa conduttività. Tale sostanza infatti genera prodotti di decomposizione ionica, incluso l'acido formico, che è carico negativamente a pH neutro e competerebbe con il DNA nella corsa sul capillare. Ciò può inoltre causare problemi sia di sensibilità che di risoluzione. E' consigliabile acquistare formammide ultrapura e congelarne immediatamente delle aliquote in modo da assicurarne la qualità.
- Il Buffer: la soluzione utilizzata per dissolvere i polimeri è importante per: stabilizzare e solubilizzare il DNA, procurare portatori di carica per la corrente elettroforetica e per incrementare l'iniezione. Se la concentrazione e concomitante conduttività del buffer sono troppo alte, la colonna si surriscalda e di conseguenza perde risoluzione.
- La Temperatura: per mantenere la denaturazione del DNA, promossa dalla formammide e dal rapido riscaldamento-raffreddamento, la temperatura della colonna deve essere maggiore di quella ambiente. Inoltre lo standard interno usato è sensibile alle variazioni di temperatura e, quindi, può essere anche assunto come indicatore di un sistema stabile e ben calibrato.

L'analisi automatizzata dei frammenti è una tecnica impiegata per rilevare piccole differenze nella lunghezza di frammenti di DNA ed è quindi particolarmente adatta per l'analisi di polimorfismi costituiti da short tandem repeats (STR). Tale metodica consiste nell'immettere una soluzione di elettroliti (frammenti di DNA) in un campo elettrico, causando la migrazione di questi ioni all'interno di un capillare contenente una matrice polimerica. I frammenti di DNA, avendo carica negativa, si muovono verso l'anodo (+) attraverso le maglie della matrice, con velocità proporzionale alle dimensioni dei frammenti stessi (Figura 3.3).

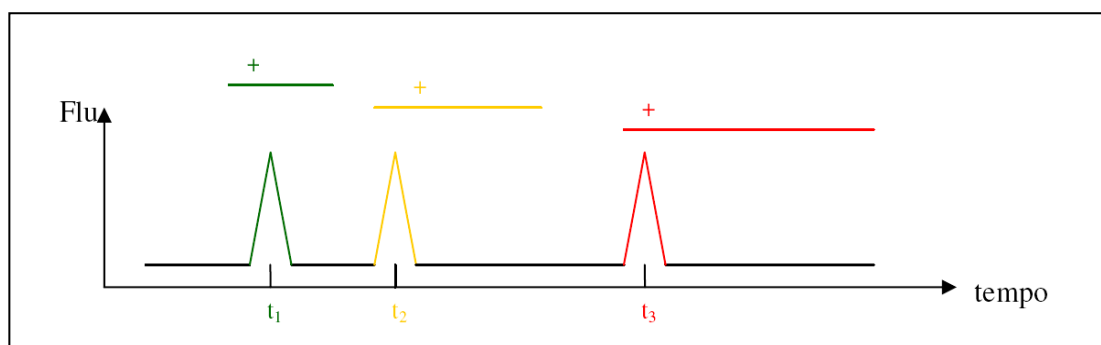


Figura 3.3: Schema della separazione di frammenti di DNA di varie dimensioni marcati con differenti fluorofori (rosso=ROX, verde=JOE, giallo=LIZ) per elettroforesi su gel capillare. Il più piccolo è più veloce ed esce per primo (t_1) mentre il più grande esce per ultimo (t_3).

La matrice per la separazione, denominata POP_6 (Performance Optimized Polymers), è costituita da gel di poliacrilammide lineare, attraverso le cui maglie passano facilmente solo i frammenti più piccoli, e da una miscela elettrolitica. In particolare si tratta di una soluzione di poli-dimetilacrilammide, presente in elevata concentrazione, dissolta in un buffer costituito da TAPS 100mM, EDTA 1mM e NaOH a pH 8. La temperatura impiegata nella corsa elettroforetica è di circa 55-60°C in modo da mantenere il DNA denaturato.

I frammenti di DNA da analizzare sono prodotti tramite PCR impiegando un primer marcato in 5' con una molecola fluorescente costituita, nel nostro caso, dal fluoroforo HEX (isomero libero dell'estere succinimidilico della 6-carbossi-2',4,4',5',7,7'-esaclorofluoresceina) con massima eccitazione a 535nm ed emissione a 556nm (Figura 3.4). Nell'analisi viene inoltre impiegato un marcatore di peso molecolare di DNA marcato a sua volta con un diverso fluoroforo, il ROX (estere succinimidilico della 5-carbossi-X-rodamina) (Figura 3.4); tale marcatore, idoneo per frammenti di grandezza compresa tra 50 e 400 bp, viene inserito nella corsa elettroforetica assieme al campione da analizzare fungendo così da standard interno per calibrarne la misura. Infatti il fluoroforo ROX, caratterizzante il marcatore, viene riconosciuto dal software dello strumento e ha lo scopo di permettere l'identificazione delle dimensioni del frammento di interesse. Il ROX possiede una elevata densità (HD) e questo significa che, nel range misurato, sono presenti 21 frammenti di DNA marcati ed opportunamente separati, al fine di rendere più accurata e precisa la misurazione del campione. Tutti i frammenti marcati vengono rilevati per fluorescenza all'emissione dal capillare e di seguito viene fornita dal software la dimensione corrispondente a ciascun frammento. Il ferogramma analizzato dal software presenterà in ascissa il peso molecolare dei frammenti separati mentre in ordinata l'intensità del picco di fluorescenza. Questo tipo di analisi viene effettuata dallo strumento "Genetic Analyzer ABI Prism 3100" che è dotato di

un sistema di rilevamento a fluorescenza multicolore in grado di analizzare più di una lunghezza d'onda durante la corsa elettroforetica. ABI Prism possiede 16 capillari della lunghezza di 36 cm, costituiti da vetro in silice fuso rivestito da polimeri lineari neutri ed aventi un diametro compreso tra 50 e 100 μ m. Una porzione dei capillari passa attraverso una finestra, la quale emette un impulso laser a 488nm (Argon Ion) che viene assorbito e rimandato dai fluorofori che passano lungo il capillare durante la separazione. La luce fluorescente viene divisa nelle sue componenti dallo spettrografo permettendo così al software Gene Scan di elaborare una separazione dei frammenti per colore affiancandola a quella elettroforetica (Figura 3.5).

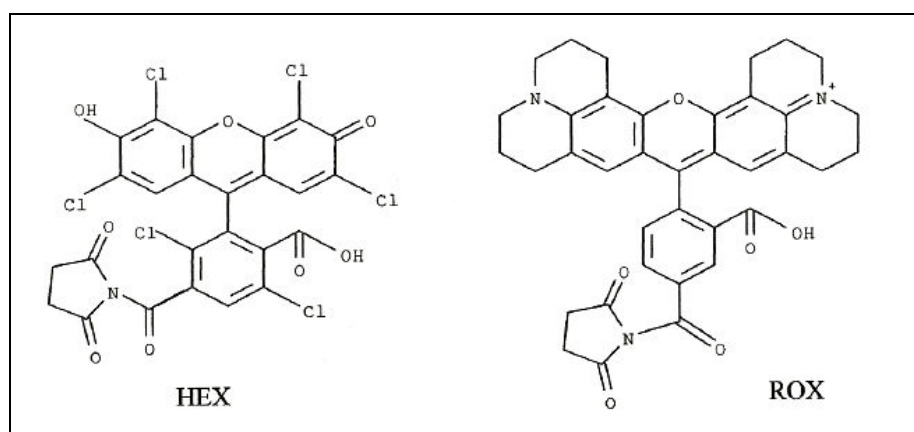


Figura 3.4: Struttura molecolare dei due fluorofori usati per caratterizzare il primer senso della PCR (HEX) e come marker molecolare (ROX) per l'analisi automatizzata dei frammenti.

Il procedimento è molto semplice. La prima fase consiste nell'amplificazione del frammento genico contenente il polimorfismo d'interesse tramite una PCR che presenti uno dei due primers marcato con il fluoroforo HEX legato covalentemente in 5' (estremità non reattiva). Poiché tale metodica è molto sensibile è sufficiente una piccola concentrazione di amplificato per condurre l'analisi. Di conseguenza, i campioni, una volta analizzati con elettroforesi su gel di agarosio, vengono opportunamente diluiti. La mix necessaria per eseguire l'analisi è costituita da 14,5 μ l di formammide deionizzata e purificata e 0,5 μ l di Internal Lane Size Standard [ROX] per ogni campione. Preparata la mix questa viene aliquotata in una piastra da 96 pozzetti e, in seguito, viene aggiunto 1 μ l di campione diluito per un totale di 16 μ l per pozzetto. La formammide è un forte denaturante ed è sufficiente il contatto con il DNA per esplicare il suo effetto. La piastra viene coperta, per evitare l'evaporazione della soluzione, e posta nel termociclatore per la denaturazione (2 minuti a 95°C). Subito dopo la denaturazione, la piastra viene posta in ghiaccio al fine di evitare il riavvolgimento dei filamenti di DNA e

viene caricata nello strumento Genetic Analyzer ABI Prism 3100 (Figura 3.5). Avviato lo strumento, i 16 capillari penetrano nella piastra e prelevano i campioni. Il caricamento di questi ultimi avviene attraverso iniezione elettrocinetica, ossia attraverso l'applicazione di un potenziale di 15KV per circa 5 secondi che fa muovere tutte le molecole cariche all'interno del capillare. Esistono delle attività di competizione da parte di molecole cariche o ioni, presenti nel campione, che possono interferire con questa fase delicata del processo. La diluizione del campione in acqua sterile e formammide purificata è utile anche a ridurre questi fenomeni di interferenza. A garanzia della corretta iniezione dei campioni nei capillari è anche il fenomeno di stacking, il quale permette ai frammenti e alla mix di essere caricati in una zona ristretta e compatta del capillare, evitando i fenomeni di diffusione del DNA. Lo stacking consiste nel produrre, subito davanti alla zona del campione, un'area di bassa conduttività; questo è reso possibile dall'immersione dei capillari in acqua prima di caricare i campioni. Dopo la prima fase di iniezione, i campioni vengono separati tramite una corsa elettroforetica e, all'uscita del capillare, vengono bombardati da un laser che eccita tutti i fluorofori che emettono fluorescenza in differenti regioni dello spettro (Figura 3.5). Un analizzatore di lunghezze d'onda multiple (camera CCD, charged-coupled device) identifica le emissioni di ogni frammento che passa nel detector (Figura 3.6). L'analisi della fluorescenza avviene sia per i frammenti incogniti che per i frammenti dello standard interno

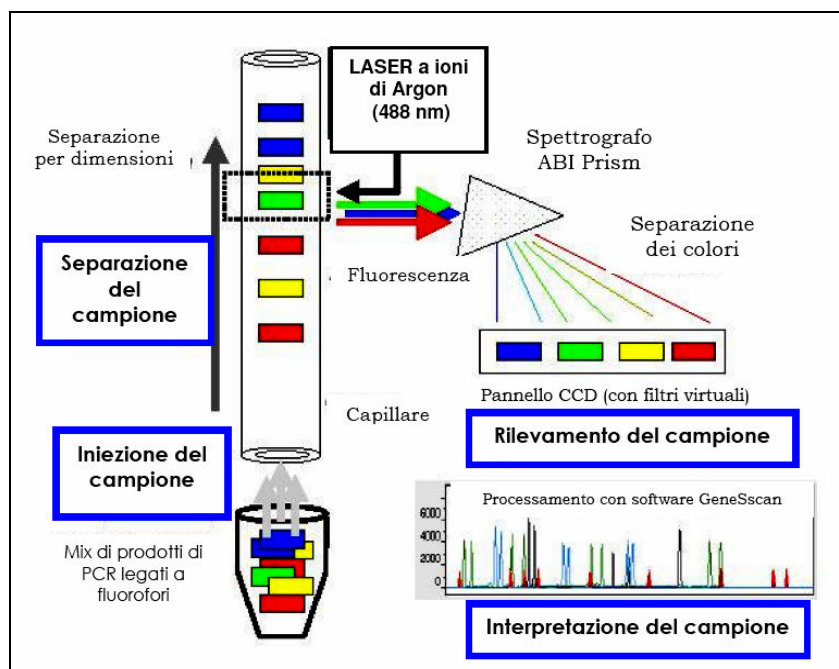


Figura 3.5: Schema del processamento di frammenti di DNA all'interno dello strumento Genetic Analyzer ABI Prism 3100. Le fasi previste sono: iniezione dei campioni, separazione dei frammenti per dimensione tramite corsa elettroforetica, determinazione della fluorescenza con camera CCD, interpretazione dei risultati con il software Gene Scan.

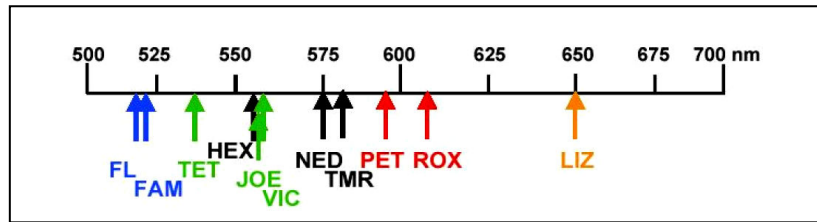


Figura 3.6 : Intervallo dello spettro visibile colto nella telecamera CCD.

Il software ABI 3100 data collection consente di controllare le condizioni della corsa elettroforetica, supervisiona quale lunghezza d'onda della luce sarà esaminata dalla camera CCD (tramite l'uso di filtri virtuali) e gestisce la creazione di file su campioni e liste di iniezione (nei quali vengono poi specificati nome del campione e ordine di processamento). L'estrazione ed elaborazione dei dati è gestita tramite il software Gene Scan analysis che permette la conversione dei dati in appropriati picchi colorati ai quali sono assegnati valori di lunghezza del frammento, in base al tempo di uscita e al tipo di emissione. In Figura 3.7 è riportata, come esempio, l'analisi del polimorfismo UGT1A1*28, costituito da una inserzione di due basi a livello del promotore del gene. In verde sono rappresentati i picchi corrispondenti al frammento di DNA incognito da analizzare, mentre in rosso sono identificati i picchi tracciati dallo standard interno. I tre differenti genotipi sono chiaramente distinguibili: gli eterozigoti presentano due picchi corrispondenti ai due frammenti wild-type e polimorfico (95 e 97 bp), gli individui wild-type presentano un solo picco a livello di 95 bp ed, infine, i soggetti omozigoti per l'allele variante mostrano un solo picco a livello di 97 bp.

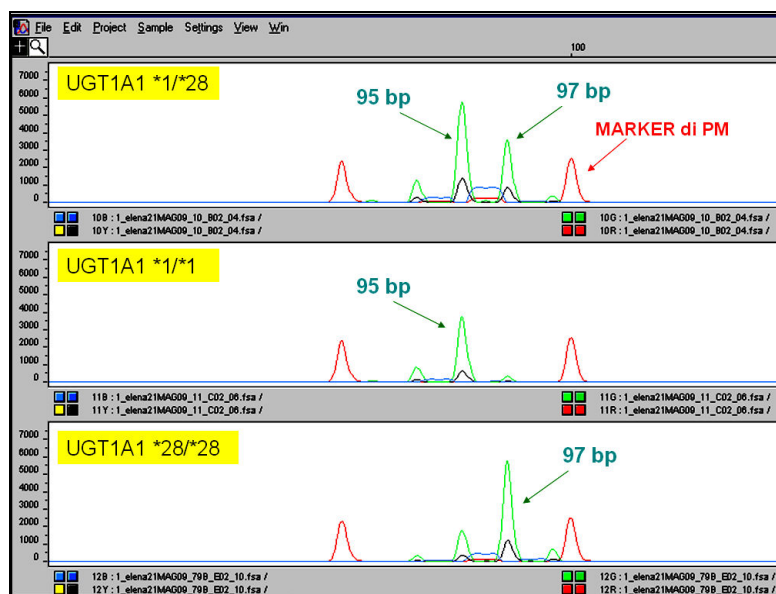


Figura 3.7: Esempio di risultati elaborati dall'ABI PRISM 3100 relativi all'analisi della delezione polimorfica UGT1A1*28 (frammento wild-type: 95bp; frammento polimorfico: 97bp)

I reagenti e le soluzioni che si sono impiegati nella metodica del sequenziatore sono:

- Aqua B. Braun Ecotainer, acqua sterile per preparazioni iniettabili, confezione da 1000 ml (B. Braun, Melsugen AG, Germany)
- Hi-Di™ Formamide (Applied Biosystems, Foster City, CA)
- Fuoroforo ROX™ DYE (5-carbossi-X-rodamina, succinil estere) (Gene Scan™ 400HD [ROX] Size Standard, Applied Biosystems, Foster City, CA)

Nella metodica del sequenziatore è stato impiegato anche lo strumento Genetic Analyzer ABI Prism 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA), gestito tramite il software Gene Scan analysis software (Applied Biosystems, Foster City, CA)

3.6.2 PYROSEQUENCING (PSQ)

Il PSQ è una tecnica di recente sviluppo che permette di identificare mutazioni di tipo puntiforme (SNP) in maniera molto semplice e veloce. Tale metodica si basa su una quantificazione luminometrica indiretta dei gruppi pirofosfato (PP_i) che vengono liberati dai nucleotidi man mano incorporati durante la sintesi di un filamento di DNA complementare ad un template stampo. Il PSQ offre numerosi vantaggi rispetto alle tradizionali tecniche di genotipizzazione: possiede una elevata accuratezza e flessibilità, è una tecnica altamente automatizzata, e permette di processare in parallelo 96 campioni nel giro di 20 minuti, offrendo così un rapido screening di un vasto pannello di SNPs [229, 230].

Tale metodica presenta una prima fase di preparazione del campione e poi l'utilizzo di uno strumento, il Pyrosequenziatore PSQ 96MA, che determina e fornisce direttamente il genotipo a livello dello SNP analizzato.

La prima fase, sfruttando l'interazione specifica biotina-streptavidina, ha lo scopo di separare i due filamenti di DNA dell'amplificato di partenza, in modo tale da ottenere un filamento singolo su cui poi si potrà appaiare il primer di sequenza da cui partirà la sintesi del filamento complementare. La porzione del gene che contiene il polimorfismo sotto indagine deve essere, quindi, inizialmente amplificata tramite una PCR che presenti uno dei due primers marcato con biotina. Al prodotto di PCR biotinilato viene poi aggiunta un eguale volume di Binding Buffer e 4 μ l di una soluzione di etanolo al 20% contenente delle "biglie" di sefarosio ricoperte di streptavidina (Streptavidin Sepharose beads); la miscela viene lasciata in agitazione per 10 minuti, in modo tale da permettere l'immobilizzazione del campione di DNA sulle beads di sefarosio, e viene poi trasferita in uno dei 96 pozzetti di una piastra

dotata di membrane filtrante (96-well filter plates). Tramite l'impiego di una pompa a vuoto, viene poi aspirato il liquido in eccesso permettendo così alle beads con legato il DNA di ancorarsi al filtro. Si prosegue quindi con l'aggiunta di una serie di tamponi seguita di volta in volta dalla aspirazione del tampone stesso: si incuba dapprima il filtro per 1 minuto con 50 μ l di Denaturation Solution, in modo tale da separare i due filamenti dell'amplificato di DNA, e si eseguono poi due lavaggi con 150 μ l di Washing Buffer per isolare e trattenere nel filtro solo il filamento singolo biotinilato eliminando il filamento complementare insieme ai liquidi di lavaggio aspirati dalla pompa a vuoto. L'ultimo passaggio consiste, infine, nel risospendere le beads con ancorato il singolo filamento di DNA in 35 μ l di Annealing Buffer e di trasferire poi questi in uno dei 96 pozzetti di un'altra piastra (PSQ 96 Plate Low) in cui si sono già prima aliquotati 8 μ l per pozzetto di una soluzione 2 μ M di primer di sequenza in Annealing Buffer; si lascia quindi incubare la piastra per 5 minuti a 60°C in modo tale da permettere l'appaiamento del primer di sequenza con il filamento di DNA biotinilato. Tutte le piastre usate presentano 96 pozzetti per il processamento in parallelo di 96 campioni. Questa prima fase di preparazione del campione può essere effettuata manualmente oppure in maniera automatizzata grazie l'impiego della piattaforma "PyroMarkTM Vacuum Prep Workstation".

Terminata la fase di preparazione del campione, la determinazione del genotipo viene poi effettuata tramite l'utilizzo del Pyrosequenziatore. In questo strumento vengono collocati sia la piastra, contenente il campione di DNA a singolo filamento appaiato con il rispettivo primer di sequenza, sia una cartuccia (PSQ 96 Reagent Cartridge) in cui vengono posti, nelle concentrazioni opportune stabilite caso per caso, i reagenti fondamentali per l'analisi, ovvero i 4 dNTPs (dATP α S, dTTP, dCTP e dGTP), una miscela con i 4 enzimi necessari (DNA polimerasi, ATP sulfurilasi, luciferasi e apirasi) ed una miscela con i 2 substrati richiesti (adenosina 5' fosfosulfato [APS] e luciferina). Bisogna sottolineare che la deossiadenosina alfa-tio trifosfato (dATP α S) viene impiegata al posto del naturale nucleotide dATP in quanto quest'ultimo non è riconosciuto dalla luciferasi. Nella Figura 3.8 sono illustrate le varie fasi del processo che avviene all'interno dello strumento. Alla miscela di reazione, come prima cosa, viene aggiunto il primo dei 4 dNTPs; se questo è complementare alla base presente nel filamento di DNA biotinilato, la DNA polimerasi catalizza la sua incorporazione nel filamento complementare in sintesi a partire dal primer di sequenza. Ogni evento di incorporazione viene accompagnato dal rilascio di un gruppo pirofosfato (PP_i) in quantità equimolare con il numero di nucleotidi incorporati (Figura 3.8.a). In presenza di adenosina 5' fosfosulfato, l'enzima ATP sulfurilasi converte poi quantitativamente il gruppo PP_i in ATP;

l'ATP guida a sua volta la conversione, catalizzata dalla luciferasi, della luciferina in oxiluciferina e ciò genera luce visibile in una quantità proporzionale alla quantità di ATP. Tale luce viene rilevata dalla componente camera CCD dello strumento e viene visualizzata tramite un picco nel programma elaborato sul monitor dal software associato allo strumento; l'analisi è di tipo quantitativo, quindi ogni segnale luminoso, e di conseguenza l'altezza di ciascun picco, è proporzionale al numero di nucleotidi incorporati (Figura 3.8.b). L'ATP in eccesso e i dNTPs non incorporati vengono poi degradati dall'apirasi al termine di ogni ciclo di incorporazione, e questo porta ad uno spegnimento del segnale luminoso e ad una rigenerazione della soluzione di reazione (Figura. 3.8.c). Quando la degradazione è completata il successivo dNTP viene aggiunto dallo strumento; i dNTPs vengono aggiunti una alla volta seguendo un preciso ordine di dispensazione basato sulla specifica sequenza da analizzare. Man mano che il processo continua il filamento complementare viene sintetizzato e la sua sequenza nucleotidica può essere facilmente determinata dall'analisi dei picchi del segnale presenti nel pirogramma ottenuto alla fine dell'intero processo (Figura 3.8.d).

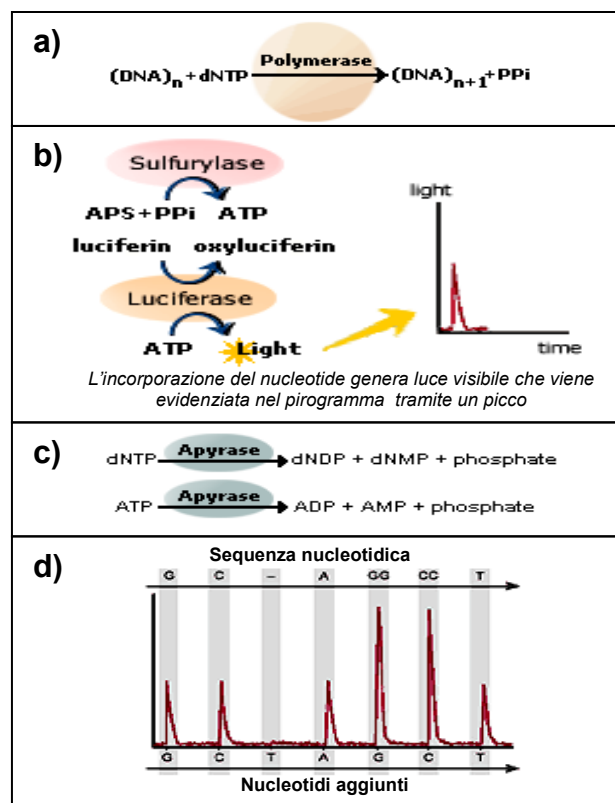


Figura 3.8: Schema del principio di funzionamento del Pyrosequencing

Il PSQ è una tecnica che può essere impiegata per determinare in maniera particolarmente attendibile il genotipo a livello di un polimorfismo a singolo nucleotide. In questo caso viene utilizzato un ordine di dispensazione (specifico per lo SNP analizzato), che è complementare al filamento biotinilato e tiene conto di tutte le possibili varianti alleliche. Lo schema di dispensazione prevede, inoltre, l'aggiunta di alcune basi non produttive (come controllo negativo) ed alcune basi non-alleleliche (come controllo positivo e come standard interno per l'analisi dell'altezza dei picchi) per assicurare precisione e correttezza al risultato. Il genotipo può essere facilmente identificato dall'analisi del pirogramma che si ottiene alla fine del processo; infatti, ciascun individuo, in base al proprio genotipo, presenterà un caratteristico pattern di segnali in corrispondenza dello SNP analizzato. In Figura 3.9 è riportata, come esempio, l'analisi del polimorfismo intronico ABCC2 IVS23 +56C>T. I tre individui con i tre differenti genotipi presentano pirogrammi chiaramente diversi e distinguibili: gli individui con genotipo CC presentano un solo picco a livello della C (Figura 3.9.a); i soggetti con genotipo TT presentano un solo picco a livello della T (Figura 3.9.b); gli eterozigoti CT presentano due picchi, a livello della C e della T, di altezza dimezzata rispetto a quelli degli individui omozigoti (Figura 3.9.c).

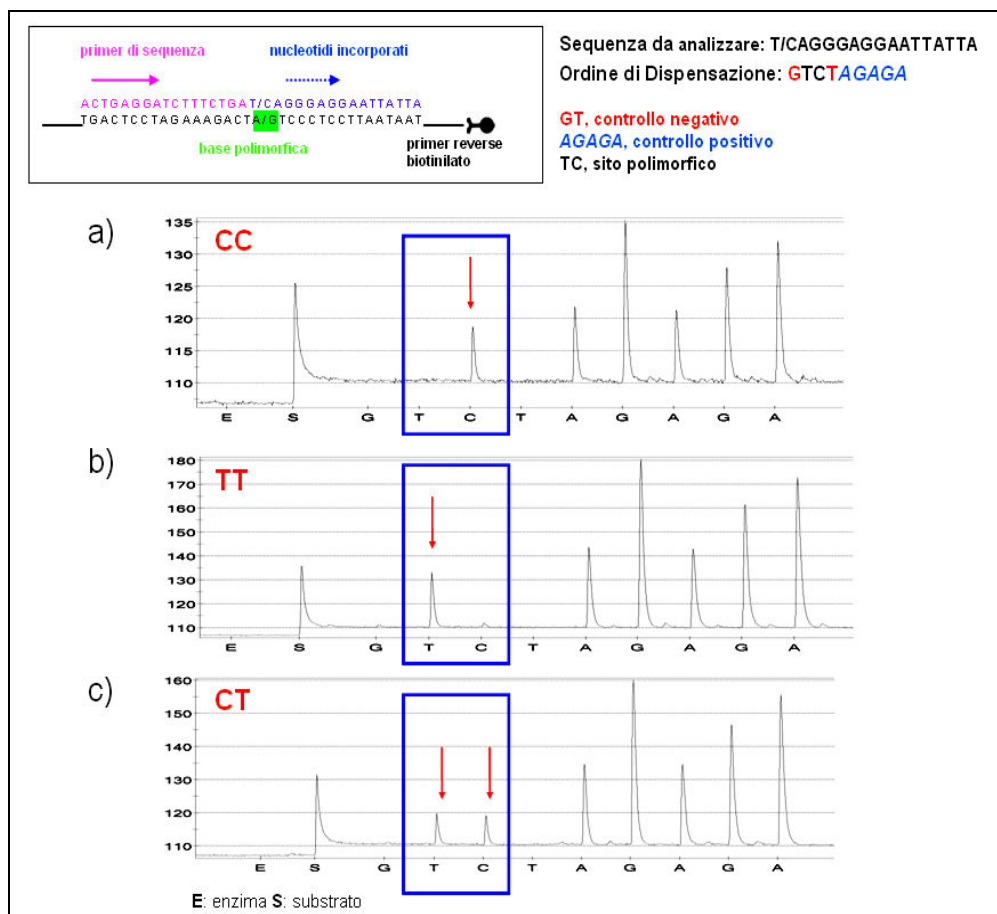


Figura 3.9: Esempio di applicazione del Pyrosequencing per l'analisi di polimorfismi.

Per il disegno del primer di sequenza, che deve essere complementare al filamento biotinilato, vengono seguite le stesse regole usate per la scelta dei primers di PCR ad eccezione della temperatura di melting che è generalmente più bassa (40°C-50°C); la lunghezza del primer di sequenza è di circa 15 basi. Il posizionamento del primer di sequenza presenta una grande flessibilità e viene scelto di volta in volta in base alle necessità del caso. Di solito, per rendere più facile e chiara la determinazione del genotipo, il primer di sequenza viene disegnato in modo tale che il suo terminale 3', dopo l'appaiamento con il filamento biotinilato, risulti collocato proprio adiacentemente alla posizione del sito polimorfico; la posizione del primer di sequenza può, comunque, flessibilmente variare in un range di 5 basi dal SNP. Quando la base polimorfica forma un omopolimero con le basi adiacenti, l'interpretazione del genotipo può risultare particolarmente difficoltosa; in questo caso il primer di sequenza deve sovrapporsi alla regione omopolimerica (Figura 3.10).

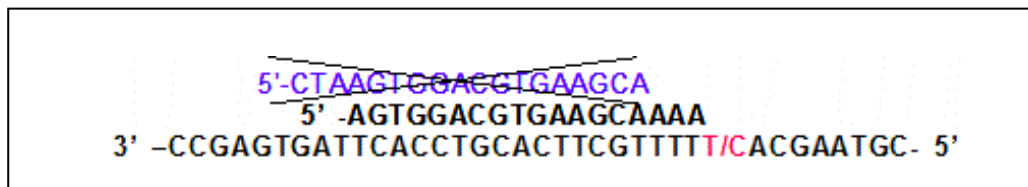


Figura 3.10: Disegno del primer di sequenza per regioni omopolimeriche adiacenti alla base polimorfica.

La tecnica del PSQ offre anche la possibilità di studiare contemporaneamente, in un unico processo, più posizioni polimorfiche (Multiplex PSQ) [231]. In particolare, se gli SNPs analizzati si trovano in posizioni vicine tra loro, si può utilizzare un unico primer di sequenza, da cui partirà poi il sequenziamento ininterrotto di tutta la regione comprensiva i polimorfismi. Nel caso in cui l'analisi "multiplex" riguardi SNPs in posizioni lontane fra loro, o addirittura localizzati su geni o porzioni di geni diversi, si possono impiegare più primers di sequenza, ognuno per uno SNP.

Per ottenere una buona analisi tramite l'uso del PSQ, il processo di PCR, impiegato per amplificare il materiale di partenza, deve essere ottimizzato il più possibile e tutti i suoi parametri devono essere settati empiricamente caso per caso. In particolare, il primer biotinilato deve essere scelto e disegnato con cura e la sua concentrazione deve essere piuttosto bassa (0,2µM) per evitare interferenze con il processo di PSQ. Inoltre i primers usati devono dare un prodotto di PCR che sia il più corto possibile, non più di 200-300 basi, in modo tale che questo sia poi facilmente catturato dalle beads di sefariosio aumentando così l'intensità del segnale. Se ad essere biotinilato è il primer di PCR antisenso (o reverse)

l'analisi al PSQ viene definita di tipo Forward (Figura 3.11.a); se ad essere biotinilato è, invece, il primer di PCR senso (o forward) l'analisi al PSQ viene definita di tipo Reverse (Figura 3.11.b).

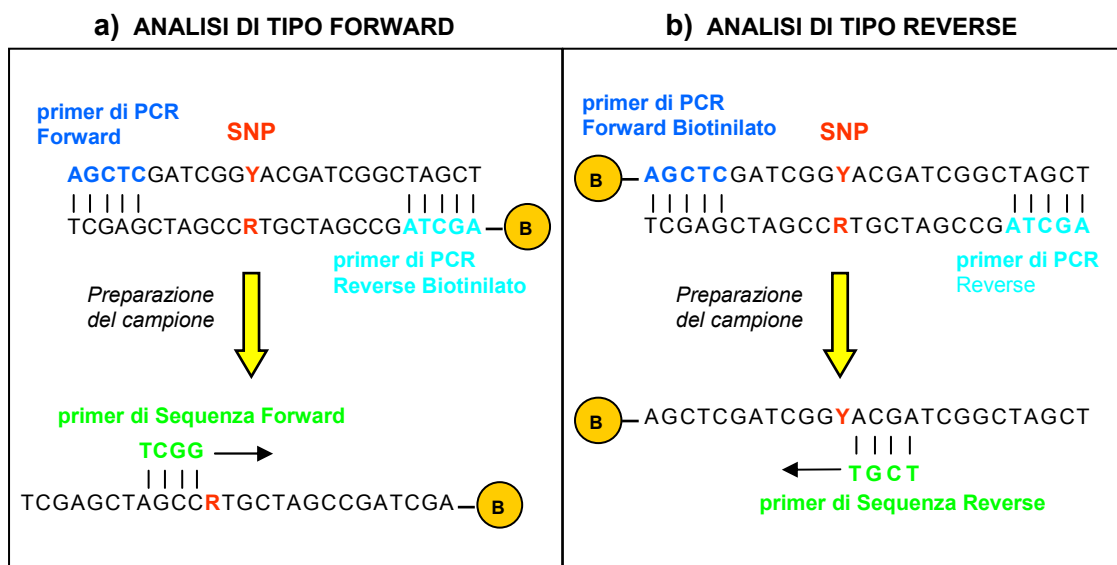


Figura 3.11: Primers di PCR e di sequenza in una analisi al Pyrosequencing di tipo Forward (a) e Reverse (b). La posizione del sito polimorfico è indicata da Y e R.

Per la messa a punto dei saggi descritti in questo lavoro di tesi è stato impiegato il “PSQ assay Design”, un software che permette di scegliere facilmente il set di primers (primer senso e antisense per la PCR e primer di sequenza per la successiva analisi al PSQ) più idoneo per lo studio di ogni specifico SNP.

L'analisi dei risultati di un esperimento al PSQ viene effettuata tramite il programma “PSQTM 96 MA software” presente nel computer a cui è collegato il Pyrosequenziatore.

I reagenti e le soluzioni che si sono impiegati nella metodica del pyrosequencing sono:

- Aqua B. Braun Ecotainer, acqua sterile per preparazioni iniettabili, confezione da 1000 ml (B. Braun, Melsugen AG, Germany)
- Streptavidin SepharoseTM High Performance, confezione da 5ml (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Sweden).
- Primer di sequenza fornito in forma liofilizzata (Sigma Genosys, Cambridge, UK) e risospeso poi in acqua sterile in modo da ottenere una concentrazione finale di 100mM.
- Pyro Gold Reagents Kit (Biotage AB, Uppsala, Sweden) costituito da:

- Enzyme mixture (luciferasi, DNA polimerasi, apirasi, sulfurilasi e proteine leganti il DNA a singolo filamento) fornito in forma liofilizzata e risospeso poi in acqua sterile.
- Substrate mixture (adenosina 5' fosfosulfato [APS] e luciferina) fornito in forma liofilizzata e risospeso poi in acqua sterile.
- dATP α S in soluzione.
- dCTP in soluzione.
- dGTP in soluzione.
- dTTP in soluzione.
- PSQTM 96 Sample Preparation Kit (Biotage AB, Uppsala, Sweden) costituito da:
 - Binding Buffer (10mM Tris-HCl, 2M NaCl, 1mM EDTA, 0,1% Tween 20; pH=7,6).
 - Denaturation Solution (0,2M NaOH).
 - Washing Buffer (10mM Tris-acetato; pH=7,6).
 - Annealing Buffer (20mM Tris-acetato, 2mM Mg-acetato; pH=7,6).

Ulteriori materiali e strumenti utilizzati nella metodica del pyrosequencing sono:

- PSQ 96 Plate Low (Biotage AB, Uppsala, Sweden).
- 96-well filter plates (Millipore, MA, USA).
- PSQTM 96 Reagent Cartridge (Biotage AB, Uppsala, Sweden).
- PSQTM 96 Sample Prep Tool Termoplate (Biotage AB, Uppsala, Sweden).
- Pipetta multicanale (Matrix Technologies Corporations, NH, USA).
- Pompa a vuoto (Millipore, MA, USA).
- Agitatore (Analitica De Mori, MI, Italia).
- Blocco termostato (Eppendorf, Hamburg, Germany).
- PyroMarkTM Vacuum Prep Workstation (Biotage AB, Uppsala, Sweden).
- Pyrosequenziatore PSQ96 MA (Biotage AB, Uppsala, Sweden), gestito tramite il software PSQTM 96 MA.
- Pyrosequencing Assay Design Software, versione 1.0.6 (Biotage, Westbrough, MA, USA).

3.6.3 DISCRIMINAZIONE ALLELICA (METODO TaqMan[®])

La discriminazione allelica consiste nella determinazione delle due varianti di una singola sequenza di acido nucleico per mezzo del “5’ nuclease fluorogenic assay”. In particolare, questa tecnica sfrutta la proprietà esonucleasica in direzione 5’→3’ della Taq polimerasi quando questa incontra, durante la sua attività di elongazione di un frammento di DNA, un oligonucleotide perfettamente appaiato con il DNA template che la Taq impiega come stampo per l’elongazione. Attraverso questa metodica è possibile investigare alterazioni polimorfiche di tipo missense. Oltre ad una elevata versatilità e flessibilità, tale metodo offre il notevole vantaggio di permettere la genotipizzazione di un elevato numero di campioni grazie ad una analisi sequela alla PCR, senza il bisogno di ricorrere ad ulteriori metodiche. Alla base della discriminazione allelica TaqMan[®] c’è l’impiego di una PCR Real Time (RT PCR), ossia di un’amplificazione dei frammenti che, in tempo reale, segue con accuratezza le diverse fasi della PCR. In alternativa, anche un semplice processo di PCR può permettere la realizzazione della metodica di discriminazione allelica con la perdita però delle informazioni derivanti dal monitoraggio in tempo reale del fenomeno dell’amplificazione e dell’analisi momento per momento di ogni singola fase della reazione.

La RT PCR, oltre ai primers senso e antisense necessari per l’amplificazione del frammento d’interesse contenente il polimorfismo, prevede l’utilizzo di un oligonucleotide che prende il nome di “probe” (sonda) e che è in grado di appaiarsi al template occupando una posizione intermedia tra il primer senso e quello antisense. Il probe è marcato alle due estremità: da una parte è presente un “quencher” (fluorocromo TAMRA) che funge da silenziatore della fluorescenza, dall’altra è legato un “reporter” (fluorocromo FAM o VIC). L’azione di silenziamento da parte del quencher avviene per trasferimento di energia da un fluorocromo all’altro quando questi ultimi si trovano vicini tra di loro. La presenza di questo oligonucleotide permette quindi di ottenere un’emissione di fluorescenza proporzionale alla quantità di prodotto di PCR ogni volta che il quencher si separa dal reporter. Vengono inseriti nell’ambiente di reazione due diversi probes allele-specifici marcati con fluorofori diversi (fluorocromo FAM o VIC, $\lambda \sim 470$ nm, ognuno caratterizzante una delle due forme alleliche). Il principio di funzionamento della metodica unisce le tre fasi fondamentali della PCR all’emissione di fluorescenza da parte del reporter specifico, legato alla sequenza polimorfica corrispondente. L’azione esonucleasica della Taq, efficace solo sul probe perfettamente appaiato al template e quindi corrispondente all’allele presente nel campione in analisi,

permette di produrre un'emissione di fluorescenza proporzionale alla quantità di amplificato corrispondente a ciascun allele. Nella reazione di discriminazione allelica, il probe, legato in maniera complementare al frammento stampo, viene staccato e digerito dalla Taq polimerasi nel momento dell'elongazione; l'allontanamento del quencher dal reporter determina l'emissione di fluorescenza da parte del fluorocromo presente in quello specifico probe: se il probe è complementare alla sequenza wild type avremo la liberazione di uno dei due fluorocromi, mentre se si appaia perfettamente alla sequenza variante la Taq determinerà la liberazione dell'altro fluorocromo (Figura 3.12).

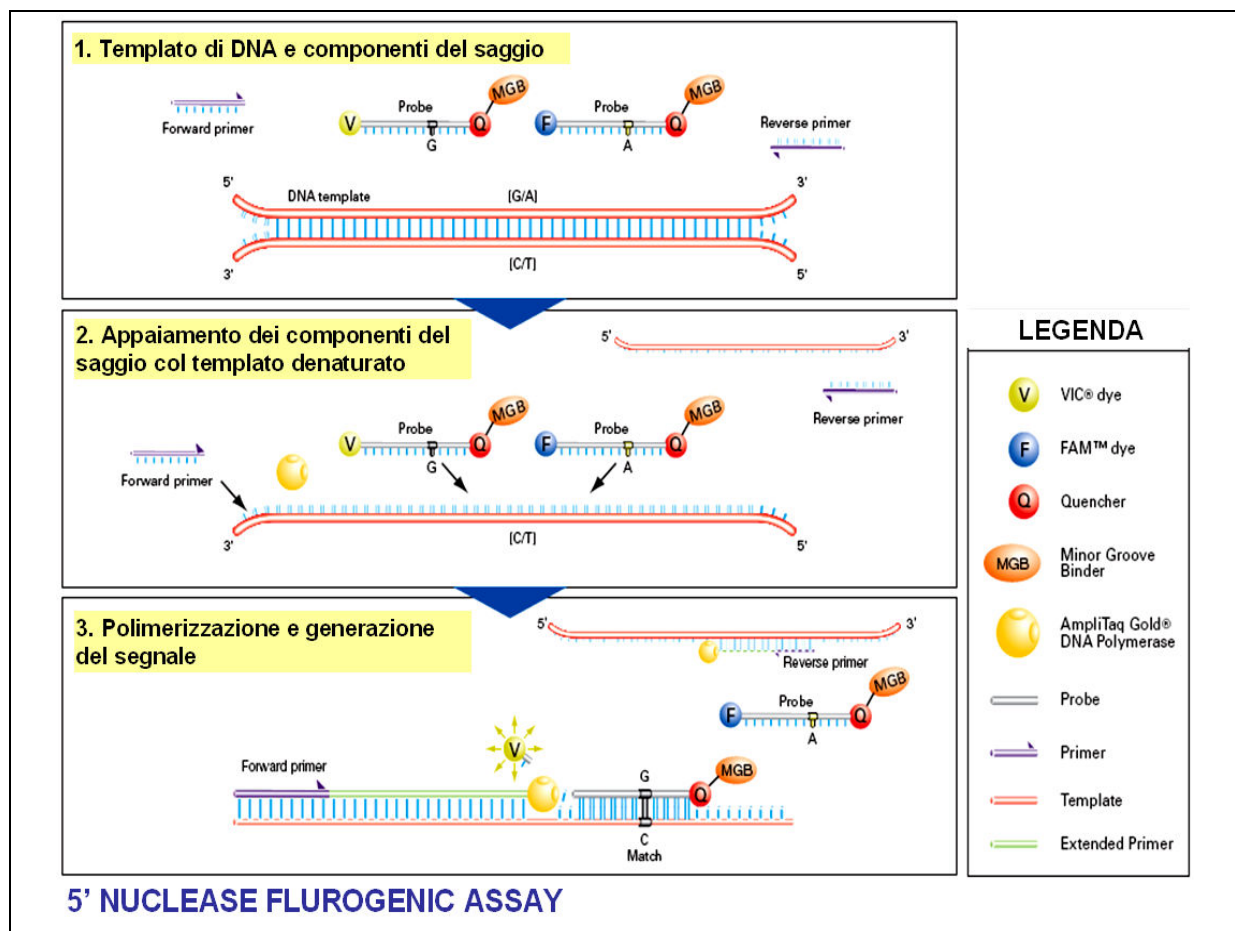


Figura 3.12: Principio di funzionamento del TaqMan® assay.

I probes vengono scelti in base ad alcune caratteristiche:

- La T_m deve essere almeno 5°C maggiore rispetto alla T_m dei due primers perché si devono legare alla sequenza nucleotidica quando si attua la sintesi del filamento complementare;
- L'oligonucleotide deve avere una lunghezza di circa 20-30 bp ed un contenuto in G e C del 50%;

- La fase di estensione deve avvenire ad una temperatura inferiore ai 72°C standard, utilizzati nella PCR, al fine di non provocare il distacco del probe dal template (per questo motivo si usano elevate concentrazioni di MgCl₂);
- Il probe non deve formare dimeri e nemmeno appaiarsi con se stesso.

Può accadere che l'oligonucleotide sonda, pur complementare al template presente nell'ambiente di reazione, non si leghi in maniera opportuna al DNA stampo, non venga di conseguenza digerito dalla polimerasi e non ci sia quindi la corrispettiva emissione di fluorescenza. In maniera opposta, in altri casi, può succedere che la Taq sia in grado di distaccare e digerire il probe anche in presenza di un mismatch e di una complementarietà non del tutto perfetta producendo così un'emissione di fluorescenza che, comunque, è pur sempre minore rispetto ad un probe perfettamente accoppiato al template. Per evitare o ridurre al minimo questi fenomeni, che alla fine possono compromettere la correttezza dell'analisi, al momento del settaggio e messa a punto del saggio è opportuno disegnare con molta attenzione il probe e scegliere le condizioni di reazione ottimali, verificando in particolare la T_a per il probe nella fase di elongazione della PCR.

Il fluorimetro integrato nello strumento ABI PRISM 7900 HT, utilizzato per la realizzazione di PCR in Real Time, rileva l'emissione di fluorescenza ad una lunghezza d'onda compresa tra 500 e 600 nm. Successivamente il software SDS 2.3, associato allo strumento, elabora i dati grezzi effettuando una clusterizzazione dei segnali di fluorescenza nei gruppi corrispondenti ai diversi genotipi. I dati ottenuti con il TaqMan® assay si presentano sottoforma di punti raggruppati e disposti in un grafico bidimensionale (Figura 3.13). In questo grafico si possono distinguere tre principali raggruppamenti: il primo, lungo l'asse delle ordinate, rappresenta i campioni omozigoti per l'allele Y; il secondo, lungo l'ascissa, determina i genotipi omozigoti per l'allele X, infine il gruppo centrale, disposto lungo la diagonale, è dato dai campioni eterozigoti che presentano entrambi gli alleli. Nel grafico dell'analisi TaqMan®, inoltre, è presente un punto che prende il nome di NTC (No Template Control) e corrisponde al controllo negativo che non deve sviluppare alcun segnale di fluorescenza (mix). Infine, può accadere che vi siano dei punti del grafico di cui non si riesce a determinare con esattezza il gruppo di appartenenza. Questi campioni, definiti come "outlier" il cui genotipo risulta "undetermined" ovvero non determinato, possono essere prodotti da: sequenze rare, assenza di amplificato della RT PCR, errore di distribuzione dei campioni, contaminazione.

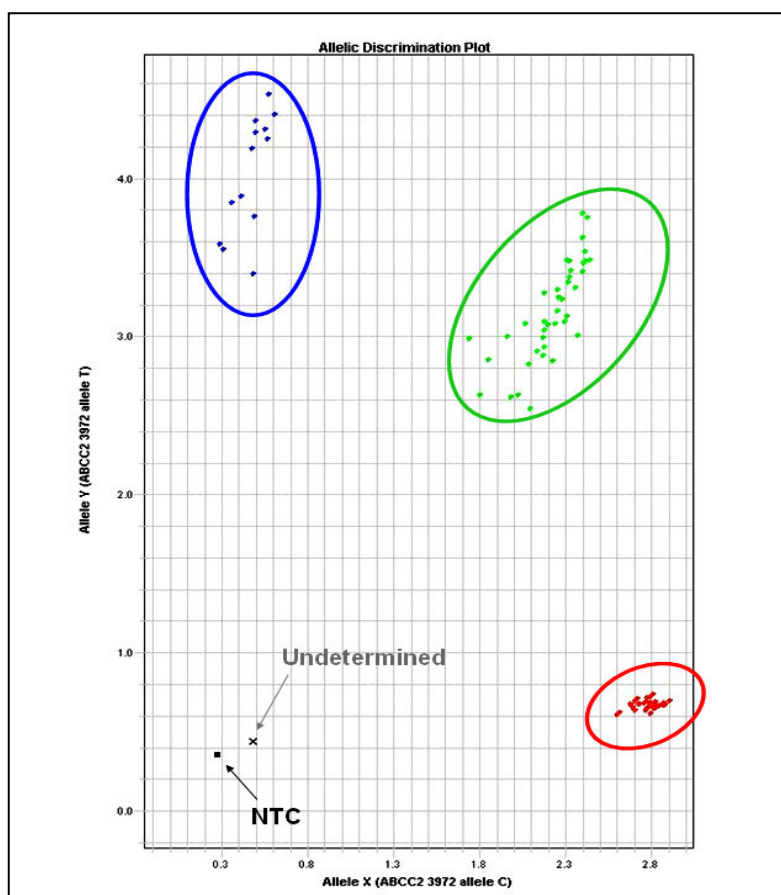


Figura 3.13: Esempio del grafico finale dell'analisi TaqMan® fornito dal software SDS 2.3 relativo al polimorfismo ABCC2 3972C>T

Il procedimento pratico della metodica TaqMan® è veramente molto semplice e permette di analizzare il genotipo in maniera rapida impiegando solamente una mix universale (master mix) ed un marker specifico per il polimorfismo d'interesse. La fase di preparazione dei campioni prevede l'impiego di piastre a 96 pozzetti. La miscela di reazione viene allestita unendo la mix specifica per la variazione genica sotto indagine (SNP Assay 20X o 40X), contenente i primers (senso ed antisenso) e i due probes marcati con VIC o FAM, alla Master Mix (TaqMan Genotyping Master Mix 2X) universale per tutte le analisi genotipiche, contenente dNTPs, Taq Polimerasi, MgCl₂ e sali in concentrazione opportuna in un ambiente adeguatamente tamponato. La soluzione viene distribuita nei pozzetti ed, infine, viene aggiunto il DNA genomico (circa 20 ng di DNA per ciascun campione). Per quanto riguarda l'SNP Assay si può impiegare un saggio preformato "TaqMan® SNP Genotyping Assay" disponibile nel catalogo on-line della Applied Biosystems (http://www3.appliedbiosystems.com/AB_Home/index.htm), oppure, se nel database non è presente il saggio per l'analisi del polimorfismo di nostro interesse, si può usufruire del servizio offerto dalla stessa ditta che, su invio della sequenza genica contenente la variazione

nucleotidica, sviluppa e testa specificatamente un saggio definito “Custom TaqMan® SNP Genotyping Assay”. Una volta allestita la piastra, questa viene coperta con una pellicola adesiva e centrifugata per qualche minuto al fine di eliminare la presenza di eventuali bolle d’aria sul fondo dei pozzetti. In seguito la piastra viene caricata nel macchinario ABI PRISM 7900HT; in questa fase vengono determinate le condizioni della RT PCR (temperature, tempi e cicli), i volumi di analisi (20µl) e soprattutto vengono assegnati i marker (VIC e FAM) agli alleli del polimorfismo. L’amplificazione viene svolta grazie il termociclatore integrato nello strumento applicando il seguente profilo termico:

- 50°C per 2 minuti
- 95°C per 10 minuti
- 40 cicli X (92°C per 15 secondi; 60°C per 1 minuto)

Al termine della reazione di PCR viene effettuata una scansione end point della piastra a 96 pozzetti contenente i campioni, allo scopo di rilevare il segnale di fluorescenza prodotto in ciascun pozzetto dai due fluorofori (FAM e VIC) utilizzati per la marcatura dei probes allele specifici. Infine, grazie all’elaborazione dei dati ottenuti per mezzo del software SDS 2.3, avviene l’attribuzione del genotipo corrispondente a ciascun campione analizzato.

Per l’analisi con il metodo TaqMan® sono stati utilizzati i seguenti reagenti:

- 2X TaqMan Genotyping Master Mix, (Applied Biosystems,CA,USA).
- 20X o 40X “TaqMan® SNP Genotyping Assay” oppure “CustomTaqMan® SNP Genotyping Assay” (Applied Biosystems,CA,USA).
- MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems,CA,USA).
- Optical Adhesive Covers (Applied Biosystems,CA,USA).
- Strumento Real-Time ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems,CA,USA).
- Software SDS 2.3 (Applied Biosystems,CA,USA).

3.7 METODICHE ANALITICHE IMPIEGATE PER LO STUDIO DEI POLIMORFISMI

I polimorfismi di interesse per questo lavoro di tesi sono stati analizzati impiegando le tecniche appena descritte.

Come prima cosa si è proceduto con la ricerca della sequenza genica, contenete la variazione nucleotidica sotto indagine, tramite l'impiego di banche dati on-line quali: "NCBI" (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>), che offre l'accesso tramite link interni a numerosi ed importanti database e strumenti bioinformatici, "SNP500Cancer" (Single Nucleotide Polymorphisms database, <http://variantgps.nci.nih.gov/cgfseq/pages/snp500.do>), "Pharmgkb" (The Pharmacogenomics Knowledge Base, <http://www.pharmgkb.org/>) e "SNPper" (CHIP Bioinformatic Tools, <http://snpper.chip.org/>). Successivamente in base alla tipologia del polimorfismo da analizzare e alle caratteristiche specifiche della sequenza nucleotidica ad esso relativa, si è scelta la metodica di genotipizzazione più idonea e si è proceduto con la sua messa a punto ed ottimizzazione utilizzando i criteri e i procedimenti sopra descritti. Nello sviluppo della tecnica analitica, per il disegno del saggio e per la scelta delle condizioni sperimentali ottimali, si sono impiegati i software dedicati alla metodica, ove presenti, oppure gli strumenti disponibili in rete come riportato nelle sezioni precedenti. In alcuni casi, più raramente, si è fatto riferimento a metodiche pubblicate in letteratura.

Di seguito viene riportata, in dettaglio, la descrizione delle metodiche di genotipizzazione impiegate per analizzare i polimorfismi genici trattati in questa tesi.

3.7.1 ANALISI DEI POLIMORFISMI DI UGTs: UGT1A1, UGT1A7 e UGT1A9

Per l'analisi dei polimorfismi UGT1A1*28 (-53(TA)₆/(TA)₇) e UGT1A9*22 (-118(T)₉/(T)₁₀), entrambi caratterizzati dalla formazione di frammenti di dimensione variabile, si è impiegata la metodica di Analisi dei Frammenti.

Innanzitutto si è amplificato, tramite PCR, il frammento genico contenente la variazione polimorfica di interesse; uno dei due primers impiegati nella PCR è caratterizzato dalla presenza in 5' del fluoroforo HEX. E' stata fatta, per ciascun campione, una miscela di reazione di 20µl in cui è stato aggiunto poi 1µl di DNA genomico (100ng/µl). Al termine della PCR, per verificare la riuscita del processo di amplificazione, si è analizzata un'aliquota di 10µl per campione tramite una corsa elettroforetica su gel d'agarosio al 3% in tampone

TAE (100V). Per effettuare l'analisi al sequenziatore automatico è sufficiente 1µl del prodotto di PCR che viene opportunamente diluito in modo tale da ottenere un segnale di corretta intensità. L'amplificato viene quindi mescolato con formammide e lo standard interno, marcato con il fluoroforo ROX, e la piastra opportunamente preparata con i campioni da analizzare viene, infine, caricata nello strumento che fornirà il risultato di genotipizzazione. La sequenza dei primers senso (forward) e antisenso (reverse), la lunghezza dell'amplificato, i componenti della miscela di reazione e le condizioni di PCR sono riassunte in Tabella 3.1.

Tabella 3.1: Sequenza dei primers, miscela di reazione e condizioni di PCR.

SNP	SEQUENZA 5'-3' dei PRIMERS e LUNGHEZZA dell'AMPLIFICATO (wt/polimorfico)	MISCELA di REAZIONE	CONDIZIONI di PCR
UGT1A1*28	<p>F (HEX) 5'-GTC ACG TGA CAC AGT CAA ACA TTA ACT TGG -3'</p> <p>R 5'- TTT GCT CCT GCC AGA GGT T-3'</p> <p>Amplificato: 95 / 97 bp</p>	<p>- Buffer di reazione 1X</p> <p>- MgCl₂ 3mM</p> <p>- dNTPs 0,25mM ciascuno</p> <p>- Primers 0,5µM ciascuno</p> <p>- <i>Polytaq</i> 1.25U</p> <p>- H₂O sterile fino a volume (<i>kit Polymed</i>)</p> <p>20µl mix + 1µl di DNA genomico.</p>	<p>- 3' a 95°C</p> <p>- 38 cicli costituiti da:</p> <p>30'' a 95°C (denat)</p> <p>30'' a 65°C (anneal)</p> <p>30'' a 72°C (elongat)</p> <p>- 10' a 72°C</p>
UGT1A9*22	<p>F (HEX) 5'-CCA AGG CAA AGA CCA TAA GC -3'</p> <p>R 5'-AGG TGG GAG AAA TAC CAG CA -3'</p> <p>Amplificato: 182 / 183 bp</p>	<p>- Buffer di reazione 1X</p> <p>- MgCl₂ 1.5mM</p> <p>- dNTPs 0,2mM ciascuno</p> <p>- Primers 0,5µM ciascuno</p> <p>- <i>Polytaq</i> 1U</p> <p>- H₂O sterile fino a volume (<i>kit Polymed</i>)</p> <p>20µl mix + 1µl di DNA genomico.</p>	<p>- 2' a 94°C</p> <p>- 35 cicli costituiti da:</p> <p>30'' a 94°C (denatur)</p> <p>30'' a 57°C (anneal)</p> <p>30'' a 72°C (elongat)</p> <p>- 7' a 72°C</p>

F: primer forward (o senso) **R:** primer reverse (o antisenso) **(HEX)** : primer marcato col fluoroforo HEX

Per l'analisi dei due polimorfismi del promotore del gene UGT1A1, UGT1A1*60 (-3279T>G) e UGT1A1*93 (-3156G>A), è stata utilizzata la tecnica del PSQ.

Come prima cosa si è amplificato, tramite una PCR che presenta il primer senso biotinilato in 5', il frammento genico contenente entrambe le variazioni nucleotidiche. In particolare, è stata fatta una miscela di reazione unica di 100µl a cui sono stati aggiunti poi 2µl di DNA genomico (100ng/µl). La sequenza dei primers e le condizioni sperimentali della PCR sono riassunte in Tabella 3.2. Al termine della PCR, per verificare la riuscita del processo di amplificazione, si è analizzata un'aliquota di 10µl per campione tramite una corsa elettroforetica su gel d'agarosio al 3% in tampone TAE (100V). I restanti 90µl sono stati

suddivisi in due parti uguali prima della preparazione dei campioni per il PSQ e sono stati poi utilizzati per effettuare separatamente l'analisi del genotipo -3279 T>G e -3156 G>A. I primer di sequenza (Seq) e le caratteristiche dell'analisi al PSQ sono riportati in Tabella 3.3.

Tabella 3.2: Sequenza dei primers, miscela di reazione e condizioni di PCR.

SNP	SEQUENZA 5'-3' dei PRIMERS e LUNGHEZZA dell'AMPLIFICATO	MISCELA di REAZIONE	CONDIZIONI di PCR
UGT1A1*60 [-3279T>G] UGT1A1*93 [-3156G>A]	F (B) 5'-CTT GGT AAG CAC GCA ATG AA -3' R 5'-CAC CAC CAC TTC TGG AAC CT-3' Amplificato: 283 bp <i>Entrambi i polimorfismi si trovano all'interno del frammento amplificato tramite PCR</i>	- PCR Gold Buffer 1X - MgCl₂ 2.5mM - dNTPs 0,2mM ciascuno - Primers 0,2μM ciascuno - Ampli Taq Gold™ 2U - H ₂ O sterile fino a volume <i>(kit Ampli Taq Gold)</i> 100μl mix + 2μl di DNA genomico.	- 10' a 95°C - 40 cicli costituiti da: 30" a 95°C (denatur.) 30" a 57°C (anneal.) 30" a 72°C (elongat.) - 10' a 72°C

F: primer forward (o senso) R: primer reverse (o antisenso) (B) : primer biotinilato

Tabella 3.3: Primer di sequenza (Seq) e caratteristiche dell'analisi al PSQ.

SNP	SEQUENZA 5'-3' del PRIMER di SEQUENZA	TIPO DI ANALISI	SEQUENZA DA ANALIZZARE	SEQUENZA di DISPENSAZIONE DELLE BASI
UGT1A1*60 [-3279T>G]	Seq 5'-TCT CAA ATT GCT TTG TTC-3'	Reverse	AC/AACTGAACT	<u>G</u> ACA/C <u>A</u> TGAC
UGT1A1*93 [-3156G>A]	Seq 5'-CCA GCC CAC CTG TC -3'	Reverse	T/CAAGCTCATTTC	<u>G</u> C/T <u>C</u> AGCTC

Basi dispensate: NN: controllo negativo NN: controllo positivo N/N: analisi del sito polimorfico

Relativamente all'isoforma UGT1A7 si sono analizzati cinque siti polimorfici tutti presenti nell'esone 1: 387T>G, 391C>A, 392G>A, 33C>A, e 622T>C. Questi polimorfismi, in differenti combinazioni, possono dar luogo a tre forme alleliche varianti: UGT1A7*2 (387T>G, 391C>A e 392G>A), UGT1A7*4 (622T>C e 33C>A) e UGT1A7*3 (tutti e cinque i polimorfismi presenti assieme); l'allele UGT1A7*1 è quello wild-type di riferimento. Per i dettagli e la rappresentazione grafica riferirsi alla Figura 1.5 presente nell' "Introduzione" di questa tesi. I dati di letteratura [127] dimostrano che i siti polimorfici presenti nell'allele UGT1A7*2 sono in totale LD così come quelli dell'allele UGT1A7*4, permettendo in tal modo la determinazione del genotipo tramite l'analisi di solo due polimorfismi a rappresentazione di tutti gli altri (tag SNP). In particolare sono state scelte le varianti 387T>G e 622T>C e si è deciso di analizzarle tramite la tecnica del PSQ.

Innanzitutto si è amplificato, tramite PCR, il frammento genico contenente le variazioni nucleotidiche di interesse. In questo caso è stata utilizzata la Nested PCR per la necessità di amplificare selettivamente solo l'esone 1 dell'UGT1A7. Il gene UGT1A, infatti, presenta una struttura particolare, spiegata nella sezione introduttiva di questa tesi, e l'esone 1 dell'UGT1A7 ha sequenza omologa (al 93%) a quello dell'isoforma UGT1A8, 9 e 10; ciò può causare l'amplificazione di tratti aspecifici che possono interferire con l'analisi, inficiandola. Per questo motivo, per amplificare selettivamente l'esone 1 dell'isoforma UGT1A7, nel primo ciclo di PCR è stato impiegato un set di primers localizzati fuori dalla regione aperta di lettura, così da ottenere un frammento lungo contenente l'intero esone 1 voluto. Il secondo ciclo di PCR è stato poi effettuato, a partire dall'amplificato opportunamente diluito, tramite l'utilizzo di primers interni. Il secondo frammento contiene i siti polimorfici target (SNP tag) a rappresentare i tre aplotipi da analizzare (UGT1A7*2, *3, *4). Bisogna sottolineare che, per poter applicare la tecnica del PSQ, nella seconda PCR si è impiegato un primer biotinilato in 5'. La sequenza dei primers impiegati nella prima e seconda Nested PCR, la lunghezza degli amplificati, i volumi di reazione e le condizioni sperimentali di PCR sono riassunti in Tabella 3.4. Al termine di ciascuna reazione di PCR, per verificare la riuscita del processo di amplificazione, si è analizzata un'aliquota di 10µl per campione tramite una corsa elettroforetica su gel d'agarosio al 3% in tampone TAE (100V). I 90µl finali sono stati utilizzati per effettuare l'analisi del genotipo al PSQ. Prima della preparazione dei campioni, la miscela di reazione è stata suddivisa in due parti uguali per effettuare separatamente l'analisi di UGT1A7*2 e *4. UGT1A7*3 si ottiene per interpolazione dei dati degli altri due alleli con metodi di tipo statistico. I primer di sequenza (Seq) e le caratteristiche dell'analisi al PSQ sono riportati in Tabella 3.5. La sequenza completa dell'esone1 dell'UGT1A7, con i rispettivi punti di annealing dei primers di PCR interni ed esterni e dei primers di sequenza impiegati nell'analisi al PSQ, è rappresentata in Figura 3.14.

Tabella 3.4: Nested PCR - Sequenza dei primers, volumi e miscela di reazione e condizioni di PCR.

SNP	SEQUENZA 5'-3' dei PRIMERS e LUNGHEZZA dell'AMPLIFICATO	MISCELA di REAZIONE	CONDIZIONI di PCR
UGT1A7 I CICLO	F 5'- CCA CGT ACT ATA TTA TAG GAG CT-3' R 5'-CCA TAG GCA ATG GCT TTC CCT GAT-3' Amplificato: 917 bp	- PCR Gold Buffer 1X - MgCl₂ 2mM - dNTPs 0,25mM ciascuno - Primers 0,5µM ciascuno - Ampli Taq Gold 1,5U - H ₂ O sterile fino a volume(<i>kit Ampli Taq Gold</i>) 30µL mix + 1µL DNA	- 10' a 95°C - 30 cicli costituiti da: 30'' a 95°C (denatur) 30'' a 57°C (anneal) 90'' a 72°C (elongat) - 7' a 72°C
UGT1A7 II CICLO	F 5'-CAC CAT TGC GAA GTG CAT TTT-3' R (B) 5'-GGG CAA AAT AAA TGT TCC TCC A-3' Amplificato: 364 bp	- PCR Gold Buffer 1X - MgCl₂ 2mM - dNTPs 0,25mM ciascuno - Primers 0,2µM ciascuno - Ampli Taq Gold 2U - H ₂ O sterile fino a volume (<i>kit Ampli Taq Gold</i>) 100µL mix + 1µL DNA della prima PCR Nested opportunamente diluito in base all'intensità della bande su gel di agarosio al 3%.	- 10' a 95°C - 30 cicli costituiti da: 30'' a 95°C (denatur) 30'' a 57°C (anneal) 90'' a 72°C (elongat) - 7' a 72°C

F: primer forward (o senso) R: primer reverse (o antisenso) (B) : primer biotinilato

Tabella 3.5 Primer di sequenza (Seq) usato e caratteristiche dell'analisi al PSQ.

SNP	SEQUENZA 5'-3' del PRIMER di SEQUENZA	TIPO DI ANALISI	SEQUENZA DA ANALIZZARE	SEQUENZA DI DISPENSAZIONE DELLE BASI
UGT1A7*2	Seq 5'-AAA TTG CAG GAG TTT GTT- 3'	Forward	TAAT/GGACA/CA/GAAA ATTAGTA	<u>G</u> TAT/ <u>G</u> IAC/ <u>A</u> AG/ <u>A</u> GTA
UGT1A7*4	Seq 5'-TGA CTT TCA AGG AGA GA -3'	Forward	GTAC/TGGAACCACAT	<u>C</u> GTA <u>C</u> T <u>C</u> GA

Basi dispensate: NN: controllo negativo NN: controllo positivo N/N: analisi del sito polimorfico

```

5'CCACGTA CTATATTATAGGAGCTTAGAATCCCAGCTGCTGGCTCTGGGCTGAAGTTCTCTGATGGCTCGTGCAGGGT
GGACTGGCCTCCTTCC(C/A)CTATATGTGTGTCTACTGCTGACCTGTGGCTTTGCCAAGGCAGGGAAGCTGCTGGTA
GTGCCCATGGATGGGAGCCACTGGTTCACCATGCAGTCGGTGGTGGAGAACTCATCCTCAGGGGGCATGAGGTG
GTCGTAGTCATGCCAGAGGTGAGTTGGCAACTGGGAAGTCACTGAATTGCACAGTGAAGACTTACTCAACCTCAT
ACACTCTGGAGGATCAGGACCGGGAGTTCATGGTTTTTGCCGATGCTCGCTGGACGGCACCATTGCCGAAGTGCATT
TCTCTATTAACAAGTTCATCCAATGGTATTTTTGACTTATTTTTTCAAAATGCAGGAGTTGTTTAA(T/G)GAC(C/A)(
G/A)AAAATTAGTAGAATACTTAAAGGAGAGTTGTTTTGATGCAGTGTTCGATCCTTTTGATGCCTGTGGCTTAAT
TGTGGCCAAATATTTCTCCCTCCCCTCTGTGGTCTTCGCCAGGGGAATATTTGCCACTATCTTGAAGAAGGTGCACA
GTGCCCTGCTCCTTTTCTATGTCCCCAGACTTCTCTTAGGGTTCTCAGACGCCATGACTTTCAAGGAGAGAGTA(T/
C)GGAACCACATCATGCACTGGAGGAACATTTATTTTGGCCCTATTTTTTCAAAAATGTCTTAGAAATAGCCTCTGAA
ATTCTCAAACCCCTGTCACGGCATATGATCTCTACAGCCACACATCAATTTGGTTGTTGCCAACTGACTTTGTTTTG
GAGTATCCCAAACCCGTGATGCCCAATATGATCTTCATTGGTGGTATCAACTGTCATCAGGGAAAGCCAGTGCCATAT
GG-3'

```

Figura 3.14: UGT1A7- nested PCR.

In blu è evidenziato l'esone 1 ed in rosso sono indicati i cinque siti polimorfici in ordine: 33C>A 387T>G, 391C>A e 392G>A, 622T>C. Le regioni di annealing dei primers impiegati nella prima PCR sono evidenziate in grigio, quelle dei primers della seconda PCT in verde. La sequenza di appaiamento dei primers di sequenza usati nella metodica del PSQ sono indicati rispettivamente in giallo per quello relativo all'analisi di UGT1A7*2 e in azzurro per quello relativi all'analisi di UGT1A7*4.(GenBank N° AF296226).

3.7.2 ANALISI DEI POLIMORFISMI DEI TRASPORTATORI DI MEMBRANA: ABCB1, ABCC1, ABCC2, ABCG2 e SLCO1B1.

Per quanto riguarda i trasportatori di membrana si sono studiati in tutto 39 polimorfismi (9 per il gene ABCB1, 10 per ABCC1, 10 per ABCC2, 7 per ABCG2 e 3 per SLCO1B1) scegliendo come metodica di genotipizzazione una di quelle disponibili nel nostro laboratorio in base alle caratteristiche della specifica variazione nucleotidica e del suo contesto genico. In particolare si è impiegata la metodica di discriminazione allelica TaqMan® per l'analisi di 27 siti polimorfici (18 "TaqMan® SNP Genotyping Assay" e 9 "Custom TaqMan® SNP Genotyping Assay"), la tecnica del PSQ per l'analisi di 11 varianti (9 in tipologia Simplex e 2 in Multiplex) ed infine il metodo di Analisi dei Frammenti per determinare una delezione genica.

Per l'analisi dei polimorfismi tramite metodica TaqMan® è stata innanzitutto allestita una miscela di reazione di 19µl per campione costituita da:

- TaqMan Genotyping Master Mix, 2X;
- SNP assay, 20X o 40X in base alla scala di sintesi fornita;
- Acqua sterile fino a volume;

La mix è stata quindi aliquotata in una piastra da 96 ed in ogni pozzetto è stato poi aggiunto 1µl di DNA genomico per un volume totale di 20µl. La piastra, opportunamente preparata e

sigillata, è stata caricata nel macchinario ABI PRISM 7900HT per effettuare l'amplificazione grazie al termociclatore integrato nello strumento. Al termine della reazione di PCR è stata effettuata la scansione della piastra per rilevare il segnale di fluorescenza prodotto in ciascun pozzetto dai due fluorofori (FAM e VIC) e, grazie al software SDS 2.3, è stata infine eseguita l'elaborazione dei dati con l'attribuzione del genotipo a ciascun campione. Le principali caratteristiche dei saggi impiegati per il metodo di discriminazione allelica sono riportate in Tabella 3.6 e 3.7. In particolare, per alcune delle varianti geniche studiate, il saggio specifico era già disponibile nel catalogo on-line della Applied Biosystems (TaqMan® SNP Genotyping Assay, Tabella 3.6); per altre, invece, non era presente e si è impiegato quindi il servizio offerto dalla stessa ditta che, su invio della sequenza genica contenente il polimorfismo da analizzare, sviluppa e testa un saggio specifico fatto su misura (Custom TaqMan® SNP Genotyping Assay, Tabella 3.7). Oltre alle garanzie offerte dal produttore, la validità e correttezza del risultato ottenuto usando un saggio di tipo Custom è stata verificata e confermata nel nostro laboratorio tramite sequenziamento di alcuni campioni random rappresentativi i diversi genotipi.

Tabella 3.6: Caratteristiche dei saggi "TaqMan® SNP Genotyping Assay"

SNP	SEQUENZA GENICA di CONTESTO AL POLIMORFISMO [VIC/FAM]**	CODICE DEL SAGGIO^^	DISPONIBILITA [§]	TIPOLOGIA DEL SAGGIO [#]
ABCB1 1236C>T	GCCCACTCTGCACCTTCAGGTTTCAG[A/G]C CCTTCAAGATCTACCAGGACGAGT	C_7586662_10	Inventoried	Drug Metabolism Assay
ABCB1 IVS9-44A>G	AACCATCAGGCTACTGAGATAGTGA[C/T]A GCAATTTTTTTTCATACTTCTTCT	C_1253826_10	Inventoried	Drug Metabolism Assay
ABCB1 IVS4-25G>T	CCTAGACCACCACAAAACAAACATA[A/C]CA TTTATGTCTCTTTAGTCTCCATT	C_15951331_20	Inventoried	Drug Metabolism Assay
ABCB1 -129T>C	CTTCTTTGAGCTTGAAGAGCCGCT[A/G]C TCGAATGAGCTCAGGCTTCTGTG	C_27487486_10	Inventoried	Drug Metabolism Assay
ABCB1 IVS13+24C>T	CATTTTTATTTTTGCACCTCTAGAA[A/G]GG CAAAGGGCAAGGACAACCTTACAT	C_11244994_20	Inventoried	Drug Metabolism Assay
ABCB1 IVS14+38A>G	GAATTAGTAGTAGAATGTTCTTATG[C/T]TT ATAAATCAGGTTGGTTTGAACATA	C_25473834_10	Inventoried	Drug Metabolism Assay
ABCC1 2158G>A	GCCTGGATTTCAGAATGATTCTCTCC[A/G]A GAAAACATCCTTTTTGGATGTCAG	C_25614385_20	Inventoried	Drug Metabolism Assay
ABCC1 IVS11-48C>T	ATAGCTGGTGATGTTGAGTGATGGG[C/T]T GATCCCAGGGTCGCCAGATGTG	C_2613102_10	Made to Order	Functionally Tested
ABCC1 IVS18-30G>C	CTAGGCAGTCTCACACATGTGCACT[C/G]A CGTGCCCGGGTGTCCCTTTGCC	C_16163640_10	Made to Order	Functionally Tested
ABCC1 -260C>G	GGTGACGGATACTGTCTTAAACAG[C/G]A TTTGAAGGTTGGTGCAGGGTGTG	C_11715816_10	Made to Order	Validated
ABCC2 -24C>T	ACAATCATATTAATAGAAGAGTCTT[C/T]GT TCCAGACGCAGTCCAGGAATCAT	C_2814642_10	Inventoried	Drug Metabolism Assay

ABCC2 3972C>T	TCCTCAGAGGGATCACTTGTGACAT[C/T]G GTAGCATGGAGAAGGTAGGTGGAG	C_11214910_20	Inventoried	Drug Metabolism Assay
ABCC2 4544G>A	CTAGACAACGGGAAGATTATAGAGT[A/G]C GGCAGCCCTGAAGAACTGCTACAA	C_22272567_30	Inventoried	Drug Metabolism Assay
ABCC2 3662T>A	CAGCGATTTCTGAAACACAATGAGG[A/T]G AGGATTGACACCAACCAGAAATGT	C_25591743_30	Inventoried	Drug Metabolism Assay
ABCG2 421C>A	GCAAGCCGAAGAGCTGCTGAGAACT[G/T]T AAGTTTTCTCTCACCCTCAGAGTG	C_15854163_70	Inventoried	Drug Metabolism Assay
ABCG2 1143C>T	AAACATCTCTTCTTACTACTCTGG[C/T]GT ATTTATTTATGACTAGCTGACAT	C_9510352_10	Made to Order	Validated
SLCO1B1 388A>G	CAGGTATTCTAAAGAACTAATATC[A/G]AT TCATCAGAAAATTCACATCGAC	C_1901697_20	Inventoried	Drug Metabolism Assay
SLCO1B1 521T>C	TCTGGGTCATACATGTGGATATATG[C/T]GT TCATGGGTAATATGCTTCGTGGA	C_30633906_10	Inventoried	Drug Metabolism Assay

** In tabella è riportato il contesto genico del polimorfismo e i fluorofori associati a ciascuna forma allelica; per convenzione le due forme alleliche presenti fra parentesi quadre sono rappresentate in ordine rispettivamente dal fluoroforo VIC e FAM. [X/Y]
X=VIC Y=FAM

^^Il saggio può essere Forward o Reverse in base alla sequenza di riferimento senso o antiseno su cui è stato creato e disegnato il saggio.

§ La disponibilità del saggio indica se il saggio è già stoccato ed inventariato (Inventored) oppure se viene prodotto al momento dell'ordine (Made to Order). In entrambi i casi i saggi devono passare le specifiche del controllo qualità prima di essere stoccati e/o spediti.

Questo parametro indica il grado di validazione del saggio e la numerosità del campione su cui è stato testato. Per dettagli fare riferimento alla scheda "TaqMan® SNP Genotyping Assay Search Results Column Descriptions" presente nel sito della Applied Biosystems (http://www3.appliedbiosystems.com/AB_Home/index.htm)

Tutte le informazioni e i dettagli relativi ai SNP assay sono disponibili nel sito della Applied Biosystems (http://www3.appliedbiosystems.com/AB_Home/index.htm) e/o vengono fornite al momento della consegna con materiale cartaceo ed informatico.

Tabella 3.7: Caratteristiche dei saggi "Custom TaqMan® SNP Genotyping Assay"

SNP	PRIMERS	PROBE**	DISEGNO [§]	ANALISI
ABCB1 1199G>A	F5'-AGTGGGCACAAACCAGATAAATTAAGG-3' R5'-ATTTATCACTGTACCTTAACTTCTTTTCGAGAT-3'	VIC-TGTTCACTTCAGTTACCC FAM-TTCACTTCAAATTACCC	Forward	VIC: G FAM: A
ABCC1 2012G>T	F 5'-TGTCGTTTCAGCATCACCTTCTC-3' R 5'-CCACCTGGCCACCAC-3'	VIC-CCCCGAAGGTGCTTT FAM-TCCCCGAAGTTGCTTT	Forward	VIC: G FAM: T
ABCC1 1303C>A	F 5'-GGAGATTGTCAACCTCATGTCTGT-3' R 5'-CATGTTAATGTACGTGGCCAAGTC-3'	VIC-ACGCTCAGAGGTTTCAT FAM-CGCTCAGAGTTTCAT	Reverse	VIC: G (C) FAM: T (A)
ABCC1 1062T>C	F 5'-CTTTGCAGTTGCTCATCAAGTT-3' R 5'-AGAAGTAGCCCTGCCAGTCT-3'	VIC-CTTCGTGTCATTACAG FAM-CTTCGTGTCGTTACAG	Reverse	VIC: A (T) FAM: G (C)
ABCC2 1249G>A	F 5'-GTCCATGGGTCCTAATTTCAATCCT-3' R 5'-CATCCACAGACATCAGGTTCACT-3'	VIC-AAGGAGTACACCGTTGGAG FAM-AGGAGTACACCAATTGGAG	Forward	VIC: G FAM: A
ABCC2 1549G>A	F5'-TGTTAGTGTATGTTTGCTATTGAGTTGTATGA-3' R 5'-TGTGGGAGAAAATATTTGCAGACCAT-3'	VIC- CCTTATAGTATAATTGGATATT FAM-TTATAGTATGTTGGATATT	Forward	VIC: A FAM: G
ABCC2 IVS26-34T>C	F 5'-CCTTGTGGTTTGTGAGTGGTTGAGT-3' R 5'-GTTTCAAGGTTTGTGTGATCTACAGA-3'	VIC-TGGTTTCTGTGCCATATGATGA FAM-TTTCTGTGCCATATGATGA	Forward	VIC: T FAM: C

ABCG2 34G>A	F 5'-CTCTCCAGATGTCTTCCAGTAATGTC-3' R 5'-CCTTCAGTAAATGCCTTCAGGCAT-3'	VIC-TCCTTGTGACAT T TGGGAT FAM-CCTTGTGACAC C TGGGAT	Reverse	VIC: A (T) FAM: G (C)
ABCG2 15622C>T	F 5'-AACCCGTGTCTGTCTCTACTAAAATTACAA-3' R 5'-CCTCCAAAGGACATGAACTCATTCTTT-3'	VIC-CAGACATGC G CCACCAC FAM-CAGACATGC A CCACCAC	Reverse	VIC: G (C) FAM: A (C)

** In giallo e grossetto è evidenziata la base polimorfica associata al fluoroforo

§ Il saggio può essere Forward o Reverse in base alla sequenza di riferimento senso o antisenso su cui è stato creato e disegnato il saggio.

Per un altro set di polimorfismi è stata impiegata la metodica del PSQ. Innanzitutto si è amplificato, tramite una PCR che presenta uno dei due primers biotinilato in 5', la regione genica contenente la variazione polimorfica di interesse. Per ciascun campione è stata fatta, quindi, una miscela di reazione 50µl a cui è stato poi aggiunto 1µl di DNA genomico (100ng/µl). Effettuati i cicli previsti dal relativo programma di PCR, per verificare la riuscita del processo, si sono controllati 10µl di amplificato tramite una corsa elettroforetica su gel d'agarosio al 3% in tampone TAE (100V). I 40µl di amplificato rimasti sono stati impiegati per l'analisi del genotipo tramite la metodica del PSQ. La sequenza dei primers e le condizioni sperimentali della PCR sono riportate in Tabella 3.8; il primer di sequenza (Seq) e le caratteristiche dell'analisi al PSQ sono riassunte in Tabella 3.9.

Per l'analisi di due varianti del gene ABCC2, -1023A>G e -1019A>G, essendo queste vicine tra loro, è stato sviluppato un saggio di tipo Multiplex.. In particolare, tramite PCR, si è amplificata la regione genica contenente entrambe le variazioni nucleotidiche e poi nell'analisi al PSQ si è usato un unico primer di sequenza, da cui parte il sequenziamento ininterrotto di tutta la regione comprensiva i polimorfismi. Per lo studio di altre 3 varianti, ABCB1 2677G>T/A [232], ABCC2 IVS23+56T>C [233] e SLCO1B1 -11187G>A [234] si è fatto riferimento alla metodica descritta in letteratura.

Tabella 3.8: Sequenza dei primers, miscela di reazione e condizioni di PCR.

SNP	SEQUENZA 5'-3' dei PRIMERS e LUNGHEZZA dell'AMPLIFICATO	MISCELA di REAZIONE	CONDIZIONI di PCR
ABCB1 3435C>T	F 5'- AGC CCA TCC TGT TTG ACT GC- 3' R (B) 5'- CCT CCT TTG CTG CCC TCA C- 3' Amplificato: 99 bp	- PCR Gold Buffer 1X - MgCl₂ 2.5mM - dNTPs 0,125mM ciascuno - Primers 0,2µM ciascuno - Ampli Taq Gold™ 1U - H ₂ O sterile fino a volume (kit Ampli Taq Gold) 50µl mix + 1µl di DNA genomico.	- 10' a 95°C - 38 cicli costituiti da: 30" a 95°C (denatur.) 30" a 60°C (anneal.) 30" a 72°C (elongat.) - 10' a 72°C

ABCB1 2677G>T/A	<p>F 5'- CTG GAC AAG CAC TGA AAG ATA AGA -3' R (B) 5'-AGC ATA GTA AGC AGT AGG GAG TAA CA -3'</p> <p>Amplificato: 136 bp</p>	<p>- PCR Gold Buffer 1X - MgCl₂ 3mM - dNTPs 0,125mM ciascuno - Primers 0,2µM ciascuno - Ampli Taq Gold™ 1U - H₂O sterile fino a volume <i>(kit Ampli Taq Gold)</i> 50µl mix + 1µl di DNA genomico.</p>	<p>- 10' a 95°C - 38 cicli costituiti da: 30'' a 95°C (denatur.) 30'' a 62°C (anneal.) 30'' a 72°C (elongat.) - 10' a 72°C</p>
ABCC1 1684T>C	<p>F (B) 5'- AGC AGC TGG TCA GTT GTG G -3' R 5'- ACC GGA GGA TGT TGA ACA AG -3'</p> <p>Amplificato: 226 bp</p>	<p>- PCR Gold Buffer 1X - MgCl₂ 3mM - dNTPs 0,125mM ciascuno - Primers 0,2µM ciascuno - Ampli Taq Gold™ 1U - H₂O sterile fino a volume <i>(kit Ampli Taq Gold)</i> 50µl mix + 1µl di DNA genomico.</p>	<p>- 10' a 95°C - 40 cicli costituiti da: 30'' a 95°C (denatur.) 45'' a 63.8°C (anneal.) 45'' a 72°C (elongat.) - 10' a 72°C</p>
ABCC1 4002G>A	<p>F 5'- TTG GGT TGA CCA GAT GAC TG -3' R (B)5'- GCA GAC TCG TTG ATC CGA AAT A -3'</p> <p>Amplificato: 188 bp</p>	<p>- PCR Gold Buffer 1X - MgCl₂ 3mM - dNTPs 0,125mM ciascuno - Primers 0,2µM ciascuno - Ampli Taq Gold™ 1U - H₂O sterile fino a volume <i>(kit Ampli Taq Gold)</i> 50µl mix + 1µl di DNA genomico.</p>	<p>- 10' a 95°C - 40 cicli costituiti da: 30'' a 95°C (denatur.) 45'' a 63°C (anneal.) 45'' a 72°C (elongat.) - 10' a 72°C</p>
ABCC1 IVS30+18G>A	<p>F 5'- AAG AGA GGA TCC ACC CAC TG -3' R (B) 5'- ACC TCA TCC AGT CCA CCA TC -3'</p> <p>Amplificato: 222 bp</p>	<p>- PCR Gold Buffer 1X - MgCl₂ 2.5mM - dNTPs 0,125mM ciascuno - Primers 0,2µM ciascuno - Ampli Taq Gold™ 1U - H₂O sterile fino a volume <i>(kit Ampli Taq Gold)</i> 50µl mix + 1µl di DNA genomico.</p>	<p>- 10' a 95°C - 40 cicli costituiti da: 30'' a 95°C (denatur.) 45'' a 60.2°C (anneal.) 45'' a 72°C (elongat.) - 10' a 72°C</p>
ABCC2 -1023G>A -1019G>A	<p>F 5'- CAG TAC AAA AGG TTG GGT CAG G -3' R (B) 5'- ACT ACA GGC ACA TGC CAA CA -3'</p> <p>Amplificato: 186 bp</p>	<p>- PCR Gold Buffer 1X - MgCl₂ 3mM - dNTPs 0,125mM ciascuno - Primers 0,2µM ciascuno - Ampli Taq Gold™ 1U - H₂O sterile fino a volume <i>(kit Ampli Taq Gold)</i> 50µl mix + 1µl di DNA genomico.</p>	<p>- 10' a 95°C - 40 cicli costituiti da: 30'' a 95°C (denatur.) 45'' a 61.2°C (anneal.) 45'' a 72°C (elongat.) - 10' a 72°C</p>
ABCC2 IVS23+56T>C	<p>F 5CGT AAG TAT CTC AAG AAC TGT CAG GTG-3' R (B)5GAG TGA CAA AAG AAC TGG AAC TGA A-3'</p> <p>Amplificato: 117 bp</p>	<p>- PCR Gold Buffer 1X - MgCl₂ 2mM - dNTPs 0,125mM ciascuno - Primers 0,2µM ciascuno - Ampli Taq Gold™ 1U - H₂O sterile fino a volume <i>(kit Ampli Taq Gold)</i> 50µl mix + 1µl di DNA genomico.</p>	<p>- 10' a 95°C - 40 cicli costituiti da: 30'' a 95°C (denatur.) 45'' a 63°C (anneal.) 45'' a 72°C (elongat.) - 10' a 72°C</p>
ABCG2 15994G>A	<p>F 5' -GTC CTG AAT GGT ATT GCC TA -3' R (B) 5'- CTT TGT GTT TCC GAA TTT CCT -3'</p> <p>Amplificato: 246 bp</p>	<p>- PCR Gold Buffer 1X - MgCl₂ 2mM - dNTPs 0,125mM ciascuno - Primers 0,2µM ciascuno - Ampli Taq Gold™ 1U - H₂O sterile fino a volume <i>(kit Ampli Taq Gold)</i> 50µl mix + 1µl di DNA genomico.</p>	<p>- 10' a 95°C - 40 cicli costituiti da: 30'' a 95°C (denatur.) 45'' a 62°C (anneal.) 45'' a 72°C (elongat.) - 10' a 72°C verificare</p>

ABCG2 16702G>A	F 5'- AAC AGG CAA CCT GAG AGA GAA G -3' R (B) 5'- CAT CCT CTT TGG TGT TCC TAG AGT-3' Amplificato: 149 bp	- PCR Gold Buffer 1X - MgCl₂ 2.5mM - dNTPs 0,125mM ciascuno - Primers 0,2µM ciascuno - Ampli Taq Gold™ 1U - H ₂ O sterile fino a volume (kit Ampli Taq Gold) 50µl mix + 1µl di DNA genomico.	- 10' a 95°C - 40 cicli costituiti da: 30'' a 95°C (denatur.) 45'' a 62.8°C (anneal.) 45'' a 72°C (elongat.) - 10' a 72°C
SLCO1B1 -11187G>A	F 5'- TGC TGC AAC CAT ATC AAC AAA -3' R (B) 5'- TGG ACA TTA AGC TCT CTT CTG AAA-3' Amplificato: 241 bp	- PCR Gold Buffer 1X - MgCl₂ 3mM - dNTPs 0,125mM ciascuno - Primers 0,2µM ciascuno - Ampli Taq Gold™ 1U - H ₂ O sterile fino a volume (kit Ampli Taq Gold) 50µl mix + 1µl di DNA genomico	- 10' a 95°C - 38 cicli costituiti da: 30'' a 95°C (denatur.) 30'' a 61°C (anneal.) 30'' a 72°C (elongat.) - 10' a 72°C

F: primer forward (o senso) R: primer reverse (o antisenso) (B): primer biotinilato

Tabella 3.9: Primer di sequenza (Seq) usato e caratteristiche dell'analisi al PSQ.

SNP	SEQUENZA 5'-3' del PRIMER di SEQUENZA	TIPO DI ANALISI	SEQUENZA DA ANALIZZARE	SEQUENZA DI DISPENSAZIONE DELLE BASI
ABCB1 3435C>T	5'- GGT GTC ACA GGA AGA GAT- 3'	Forward	C/TGTGAGGGC	<u>A</u> C/T <u>A</u> GTGAG
ABCB1 2677G>T/A	5'- GAT AAG AAA GAA CTA GAA GG -3'	Forward	TG/A/TCTGGGAA	T <u>G</u> /A <u>G</u> CTG
ABCC1 1684T>C	5'- GAC GGC AAA TGT GCA -3'	Reverse	CAA/GGGCCACCT	<u>G</u> C/A <u>G</u> I <u>C</u> ACT
ABCC1 4002G>A	5'- ACG GGA GCT GGG AAG -3'	Forward	TCG/ATCCCTG	<u>G</u> T <u>C</u> G/A <u>G</u> TCT
ABCC1 IVS30+18G>A	5'- CAA AGC CTA GAG GCC -3'	Forward	AC/TTGTGCCAGT	<u>G</u> A <u>C</u> T <u>C</u> GTGC
ABCC2 -1023G>A -1019G>A	5'- CTT TGG GAG GCC AAG -3'	Forward	G/ACAGG/AAGATT	T <u>G</u> /A <u>G</u> CAG/A <u>C</u> GAT
ABCC2 IVS23+56T>C	5'- ACT GAG GAT CTT TCT GA -3'	Forward	T/CAGGGAGGAATT	<u>G</u> T/ <u>C</u> IAGAGA
ABCG2 15994G>A	5'- TTG AGT TAA TTT TTG TAT AA -3'	Forward	G/AGTGTAAAGAA	<u>C</u> A <u>G</u> C <u>T</u> GTAG
ABCG2 16702G>A	5'- GAG AAG GGA AAA TGC A -3'	Forward	G/ACAAAATGGGTA	T <u>G</u> /A <u>G</u> CATGT
SLCO1B1 -11187G>A	5'- ATA TAT ATG TGC ATA TGT G -3'	Forward	TATACAA/GGTAAAA	<u>G</u> TATACA/ <u>G</u> C <u>T</u>

Basi dispensate: NN: controllo negativo NN: controllo positivo N/N: analisi del sito

Infine, per il polimorfismo ABCG2 -19572/19569 CTCAdel, costituito da una delezione di quattro nucleotidi, si è scelto di impiegare il metodo di analisi dei frammenti. La tecnica, una volta messa a punto, è stata verificata tramite sequenziamento.

Come prima cosa si è amplificato, tramite una PCR il frammento genico contenente la delezione da analizzare; il primer reverse impiegato nella PCR è caratterizzato dalla presenza in 5' del fluoroforo HEX. E' stata fatta, quindi, per ciascun campione, una miscela di reazione di 20µl in cui è stato aggiunto poi 1µl di DNA genomico (100ng/µl). Al termine della PCR, 10µl di amplificato sono stati controllati su un gel di agarosio al 3% in tampone TAE (100V) e sono stati poi adeguatamente diluiti per l'elettroforesi capillare. Per ciascun campione, 1µl di amplificato diluito è stato aggiunto a 0,5µl di standard interno, marcato con il fluoroforo ROX, e a 14,5 µl di formammide deionizzata. Quindi i campioni sono stati analizzati attraverso l'elettroforesi capillare. La sequenza dei primers, la lunghezza dell'amplificato e le caratteristiche sperimentali della PCR sono riassunte in Tabella 3.10.

Tabella 3.10: Sequenza dei primers, miscela di reazione e condizioni di PCR.

SNP	SEQUENZA 5'-3' dei PRIMERS e LUNGHEZZA dell'AMPLIFICATO (wt/polimorfico)	MISCELA di REAZIONE	CONDIZIONI di PCR
ABCG2 19572/19569CTCAdel	F 5'- AAC TTT CCT GCA TTG GGT GA -3' (HEX) R 5'- TGC AAT ATT CCG ATG GTG TG -3' Amplificato: 244 / 240 bp	- PCR Gold Buffer 1X - MgCl₂ 3mM - dNTPs 0,125mM ciascuno - Primers 0,2µM ciascuno - Ampli Taq Gold™ 1U - H ₂ O sterile fino a volume (kit <i>Ampli Taq Gold</i>) 20µl mix + 1µl di DNA genomico	- 10' a 95°C - 38 cicli costituiti da: 30' a 95°C (denatur.) 30' a 60.5°C (anneal.) 30' a 72°C (elongat.) - 10' a 72°C

F: primer forward (o senso) R: primer reverse (o antisenso) (HEX): primer marcato col fluoroforo HEX

3.7.3 ANALISI DEI POLIMORFISMI DEI CITOCROMI: CYP3A4 e CYP3A5

Per lo studio dei polimorfismi CYP3A4*1B (-392A>G) e CYP3A5*3 (6986G>A) è stato impiegato il metodo del PSQ. Il procedimento per l'analisi delle due variazioni polimorfiche è simile; innanzitutto si è amplificato il frammento genico di interesse tramite una PCR che presenta il primer antisense biotinilato. E' stata fatta, quindi, per ciascun campione, una miscela di reazione di 50µl in cui è stato aggiunto poi 1µl di DNA genomico (100ng/µl). In seguito 10µl di amplificato sono stati controllati attraverso elettroforesi su gel di agarosio al 3% in tampone TAE (100V), mentre il volume rimanente è stato utilizzato nella analisi al

PSQ. Per le metodiche di PCR e PSQ si sono adottate le condizioni di reazione presenti rispettivamente in tabella 3.11 e 3.12.

Tabella 3.11: Sequenza dei primers, miscela di reazione e condizioni di PCR.

SNP	SEQUENZA 5'-3' dei PRIMERS e LUNGHEZZA dell'AMPLIFICATO	MISCELA di REAZIONE	CONDIZIONI di PCR
CYP3A4*1B	F 5'- ATC TGT AGG TGT GGC TTG T- 3' R (B) 5'- GGG TTC TGG GTT CTT ATC A- 3' Amplificato: 140 bp	- PCR Gold Buffer 1X - MgCl₂ 2.5mM - dNTPs 0,125mM ciascuno - Primers 0,2µM ciascuno - Ampli Taq Gold™ 1U - H ₂ O sterile fino a volume (kit Ampli Taq Gold) 50µl mix + 1µl di DNA genomico.	- 10' a 95°C - 35 cicli costituiti da: 30" a 95°C (denatur.) 30" a 57°C (anneal.) 30" a 72°C (elongat.) - 7' a 72°C
CYP3A5*3	F 5'- ACC ACC CAG CTT AAC GAA TG - 3' R (B) 5'- TGA CAC ACA GCA AGA GTC TCA - 3' Amplificato: 156 bp	- PCR Gold Buffer 1X - MgCl₂ 1.6mM - dNTPs 0,125mM ciascuno - Primers 0,2µM ciascuno - Ampli Taq Gold™ 1U - DMSO 2% - H ₂ O sterile fino a volume (kit Ampli Taq Gold) 50µl mix + 1µl di DNA genomico.	- 10' a 95°C - 38 cicli costituiti da: 30" a 95°C (denatur.) 30" a 65°C (anneal.) 30" a 72°C (elongat.) - 10' a 72°C

F: primer forward (o senso) R: primer reverse (o antisenso) (B): primer biotilato

Tabella 3.12: Primer di sequenza (Seq) usato e caratteristiche dell'analisi al PSQ.

SNP	SEQUENZA 5'-3' del PRIMER di SEQUENZA	TIPO DI ANALISI	SEQUENZA DA ANALIZZARE	SEQUENZA DI DISPENSAZIONE DELLE BASI
CYP3A4*1B	5'- CCA TAG AGA CAA GGG CA- 3'	Forward	A/GGAGAGAGG	<u>C</u> A/G <u>C</u> CAGAGA
CYP3A5*3	5'- AGA GCT CTT TTG TCT TTC A- 3'	Forward	G/ATATCTCTCC	<u>C</u> A/G <u>C</u> TATCT

Basi dispensate: **NN**: controllo negativo **NN**: controllo positivo **N/N**: analisi del sito

3.8 LINKAGE DISEQUILIBRIUM ED ANALISI APLOTIPICA

Il Linkage Disequilibrium (LD) è un termine dell'ambito genetico che indica la presenza di un'associazione statistica non-casuale tra alleli relativi a due o più loci, presenti sullo stesso cromosoma. Il LD descrive una situazione in cui alcune combinazioni di alleli o marcatori genetici si verificano più o meno frequentemente in una popolazione rispetto a quello che ci si aspetterebbe da una formazione casuale di aplotipi da alleli in base alle frequenze di questi. Ciò significa, in pratica, che polimorfismi in stretta correlazione uno con l'altro tendono ad essere ereditati assieme e, di conseguenza, analizzare uno di questi riflette la variazione degli altri markers genici associati, facilitando così il complesso lavoro di analisi molecolare. Associazioni non-casuali tra polimorfismi a differenti loci vengono misurate dal grado di LD. Il livello di LD è influenzato da numerosi fattori, tra cui il linkage genetico, il tasso di ricombinazione o mutazione genetica, fenomeni di deriva genetica casuale e accoppiamento non-casuale e dalla struttura della popolazione.

La deviazione della frequenza osservata di un aplotipo rispetto a quella attesa è una quantità comunemente descritta dal coefficiente di Lewontin's (D'). Il valore di questo coefficiente è compreso fra 0 e 1 dove 0 indica un Linkage Equilibrium mentre 1 indica un Linkage Disequilibrium; in altre parole più il valore tende ad 1 più elevato è il grado di associazione. Un'altra misura del LD, alternativa a D' , è rappresentata dal coefficiente di correlazione fra coppie di loci indicato con r^2 . Questo coefficiente, anch'esso compreso fra 0 e 1, è adattato e aggiustato per loci aventi frequenze alleliche differenti. Un perfetto LD è definito quando le frequenze alleliche sono identiche e di conseguenza solo due aplotipi possono esistere ($D'=1$, $r^2=1$); un LD completo è presente, invece, quando la frequenza allelica non è identica ed esistono quindi almeno tre aplotipi ($D'=1$, $r^2<1$) [235]. La definizione dei rapporti di LD tra i polimorfismi studiati può essere utile per definire gli aplotipi, ovvero la particolare combinazione di varianti alleliche in una specifica regione di un cromosoma, i quali possono risultare più informativi rispetto all'analisi di una singola variazione polimorfica. I polimorfismi utilizzati negli studi di associazione, infatti, in certi casi, non sono sufficienti a predire o giustificare un effetto fenotipico, come ad esempio l'esito farmacologico di un medicinale. Spesso è difficile valutare se il polimorfismo descritto abbia causato l'esito, se invece sia solo ereditato assieme al polimorfismo causativo o se ci siano delle interazioni tra i due polimorfismi che possano dar luogo a quella manifestazione fenotipica. In questo senso può essere più utile valutare la combinazione di più varianti alleliche ovvero gli aplotipi.

In questo lavoro di tesi, l'analisi delle possibili relazioni di LD e la determinazione statistica dei più comuni aplotipi è stata effettuata per i polimorfismi della famiglia dell'UGT1A e per alcune delle varianti geniche dei trasportatori di membrana in base alle indicazioni fornite dalla letteratura (vedere la parte introduttiva per ulteriori dettagli). La valutazione dei rapporti di LD è stata eseguita tramite il programma "LDPlotter", disponibile gratuitamente in rete al sito "Innate Immunity in Heart, Lung and Blood Disease, Programs for Genomic Applications (IIPGA)" (<http://www.pharmgat.org/IIPGA2/Bioinformatics/>); grazie a questo software si è calcolato il valore del coefficiente di Lewontin's (D') e del coefficiente di correlazione r^2 . Il programma offre inoltre la possibilità di visualizzare graficamente le relazioni di LD tramite intensità di colore diverse. La costruzione degli aplotipi è stata realizzata tramite il software "Phase" sempre disponibile nel sito web IIPGA.

3.9 ANALISI FARMACOCINETICHE

Per l'analisi dell'irinotecano e dei suoi metaboliti è stata raccolta, in provette eparinizzate, una serie di campioni di sangue periferico a partire da prima della somministrazione del farmaco e poi a 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.25, 2.50, 2.75, 3.0, 3.50, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0, 14.0, 26.0, 50.0 ore a seguire l'inizio dell'infusione di irinotecano. Il plasma è stato immediatamente separato dal sangue intero per centrifugazione (3000X g per 15' a 4°C) e conservato in freezer a -80°C fino al momento dell'analisi. La concentrazione totale plasmatica di irinotecano (forma lattonica più carbossilata) e dei suoi metaboliti, SN-38 e SN-38G, è stata determinata tramite l'impiego della cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) con rilevamento fluorescente, seguendo la procedura descritta in letteratura [236, 237] a cui sono state apportate solo minime modifiche. Questa parte di lavoro sperimentale è stata condotta dall'unità di farmacocinetica del nostro laboratorio.

Per determinare i parametri farmacocinetici di CPT-11, SN-38 e SN-38G sono state utilizzate analisi non-compartimentali. I dati di concentrazione plasmatica nel tempo, osservati per ogni specie tramite HPLC, sono stati inseriti in coordinate semi-logaritmiche per stimare graficamente la durata della fase finale di eliminazione. Le costanti di velocità di eliminazione terminale sono state determinate con un'analisi di regressione della curva concentrazione plasmatica-tempo, effettuata tramite il logaritmo lineare. L'emivita è stata calcolata come $0.693/k$. Per calcolare l'area sotto la curva di concentrazione del farmaco nel tempo, dal tempo 0 (AUC 0-last) al tempo dell'ultimo campionamento (C last), è stato utilizzato un metodo di integrazione numerica trapezoidale tramite il logaritmo lineare. L'area sotto la curva concentrazione plasmatica di CPT-11, SN-38 e SN-38G nel tempo, fino a tempo infinito, è stata ottenuta aggiungendo $C \text{ last} / k$ ad AUC 0-last. Per i 10 pazienti nei quali il campionamento completo era impraticabile, l'AUC del CPT-11, SN-38 e SN-38G è stata stimata con un protocollo di campionamenti limitati, in accordo con il modello proposto da Sloan et al. [238]. Questo metodo prevede che una buona valutazione dei parametri farmacocinetici possa esser ottenuta misurando le concentrazioni plasmatiche alla fine dell'infusione e a 4h, 8h, 48h dopo la fine dell'infusione. L'efficienza della glucuronazione dell'SN-38 in SN-38G nel plasma (glucuronidation ratio, GR) è stata definita come il rapporto fra l'AUC dell'SN-38G e l'AUC dell'SN-38 $[(AUC \text{ SN-38G} / AUC \text{ SN-38})]$. L'indice biliare (biliary index, BI) dell'SN-38 è stato definito come il prodotto tra l'AUC del CPT-11 e il rapporto fra l'AUC dell'SN-38 e l'AUC dell'SN-38G $[AUC \text{ CPT-11} \times (AUC \text{ SN-38} / AUC \text{ SN-38G})]$. Si considera questo indice come un surrogato della misura della

concentrazione di SN-38 nella bile. I precedenti parametri farmacocinetici sono stati utilizzati per interpretare la correlazione fra i differenti genotipi/aplotipi e il fenotipo osservato .

3.10 ANALISI STATISTICA DEI DATI

Per l'analisi statistica dei dati sono stati utilizzati i programmi "GraphPad InStat®" versione 3.10 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA), "STATISTICA™" versione 5.5 (StatSoft, Tulsa, OK) e il software "R" versione 2.8.0 (The R Project for Statistical Computing).

La distribuzione delle caratteristiche individuali demografiche e cliniche è stata esaminata tramite semplici strumenti di statistica descrittiva. La correlazione tra genotipo/aplotipo e outcome della terapia in termini di tossicità severa, grado di risposta tumorale (CR+PR) e clinical benefit (CR+PR+SD), è stata valutata inizialmente tramite un'analisi univariata impiegando il Test Esatto di Fisher. Questo test permette di determinare, oltre al valore di p (p-value) come indice di significatività dei dati, anche il valore di Odds Ratio (O.R.) ed il corrispondente intervallo di confidenza calcolato al 95% (95% CI). Nel caso in cui una variante genica includa pochi casi (≤ 3) nel gruppo di soggetti omozigoti polimorfici, questi sono stati raggruppati con il gruppo di eterozigoti; inoltre è stato valutato il ruolo predittivo non solo del genotipo ma anche quello dell'allele wild-type e polimorfico, combinando gli eterozigoti con i rispettivi gruppi omozigoti. Per stimare il rischio relativo di un certo evento tra soggetti con un differente stato polimorfico e controllare al contempo la presenza di possibili fattori "outliers" confondenti, è stata effettuata, quindi, un'analisi multivariata andando a costruire un modello di regressione logistica step-by-step in cui sono state incluse le varianti geniche e le caratteristiche clinico-demografiche dei pazienti (sesso, età, sito del tumore primario [colon destro/sinistro, retto], stadio tumorale TNM, che mio/radioterapia adiuvante sì/no, chirurgia radicale sì/no, numeri di siti metastatici] selezionate dall'analisi univariata. (cut-off < 0.1).

Per lo studio del ruolo dei polimorfismi nell'influenzare la sopravvivenza (OS) e il tempo alla progressione tumorale (TTP) sono stati impiegati il metodo del prodotto-limite di Kaplan-Meier e il Test statistico di log-rank. Il primo metodo è stato impiegato per tracciare la curva raffigurante la sopravvivenza o il tempo alla progressione e per calcolare il tempo mediano di sopravvivenza o di progressione; il Test di log-rank, invece, è stato impiegato per confrontare le curve ottenute per ciascun genotipo/aplotipo e per testare statisticamente la loro differenza. La determinazione del rischio relativo di morte o progressione in pazienti con uno status genotipico/aplotipico differente è stata effettuata tramite un'analisi univariata e multivariata impiegando il "Cox proportional hazards regression model", una procedura statistica che permette di calcolare il valore di hazard ratio (HR) e il corrispondente intervallo di confidenza al 95% (95% CI); nell'analisi multivariata sono state incluse le varianti geniche

e clinico-demografiche selezionate dall'analisi univariata. (cut-off <0.05). Inoltre, anche in questo caso, è stato valutato il ruolo predittivo non solo del genotipo ma anche quello dell'allele wild-type e polimorfico, combinando gli eterozigoti con i rispettivi gruppi omozigoti. La sopravvivenza è stata computata come i mesi intercorsi dalla data della prima somministrazione fino alla data del decesso o dell'ultimo controllo, mentre il tempo alla progressione è stato calcolato come i mesi intercorsi dalla data della prima somministrazione fino alla data della constatazione di recidiva o dell'ultimo controllo.

Le relazioni fra parametri farmacocinetici e genotipo sono state indagate con metodi non parametrici: il test di U-Mann Whitney per la comparazione fra due gruppi e il test di Kruskal-Wallis per il confronto fra gruppi multipli.

In questo lavoro sono stati considerati significativi valori di p inferiori a 0.05 ($p < 0.05$). Vista la natura esplorativa dello studio non è stato effettuato nessun aggiustamento per comparazioni multiple del valore di p .

Per la valutazione dell'equilibrio di Hardy-Weinberg (HWE) nella distribuzione di ciascun marker genico investigato è stato impiegato il software disponibile nel sito web IIPGA già citato precedentemente. Un valore di $p < 0.05$ indica una mancanza di accordo con HWE [239].

4. RISULTATI

4.1 CARATTERISTICHE DEI PAZIENTI E TRATTAMENTO

Lo studio multicentrico ha visto l'arruolamento di duecento-sessantasette pazienti con CCR metastatico. Diciassette di questi non sono stati ritenuti eleggibili e sono stati rimossi dall'analisi (dieci pazienti non avevano lesioni metastatiche misurabili al momento dell'inserimento nello studio, cinque erano stati precedentemente trattati per la malattia metastatica, uno non aveva una diagnosi istologica di adenocarcinoma colonrettale ed uno aveva precedentemente sviluppato una seconda neoplasia). I casi con CCR metastatico istologicamente confermato considerati eleggibili ed inclusi nello studio sono stati 250; di questi 162 sono uomini e 88 donne, con età compresa tra i 26 e 75 anni (età media 60 anni) e tutti appartenenti all'etnia caucasica con provenienza dalla medesima area geografica (Nord-Est Italia). Ai 250 pazienti eleggibili, trattati in prima linea con regime FOLFIRI, sono stati somministrati, in totale, 2151 cicli (media 8; intervallo 1-20) di chemioterapia. Le caratteristiche demografiche e cliniche dei pazienti al momento dell'inserimento nello studio sono riportate in Tabella 4.1; in particolare si sono considerati il sito primario del tumore, il numero e la localizzazione dei siti di metastasi, lo stadio (TNM), l'eventuale asportazione chirurgica radicale del tumore primario e l'eventuale somministrazione di chemioterapia o radioterapia adiuvanti.

Tabella 4.1: Caratteristiche demografiche e cliniche dei pazienti all'inserimento nello studio

CARATTERISTICHE	N	%
Totale pazienti arruolati	267	
Eleggibili	250	
[#] Non eleggibili	17	
Genere		
Maschile	162	64.8
Femminile	88	35.2
Età (anni)		
Media	60.6	
Deviazione Standard	10.3	
Range	26-75	
Sito primario del tumore		
Colon	179	71.6
<i>Destro</i>	79	44.1
<i>Sinistro</i>	100	55.9
Retto	71	28.4
Sito metastatico		
Fegato	181	
Polmone	83	
Altro	80	
Numero di siti metastatici		
1	108	43.2
≥2	142	56.8
Chirurgia radicale del tumore primario		
Si	200	80.0
No	50	20.0
[§] Stadio della malattia al momento della diagnosi		
I	5	2.0
II	20	8.0
III	65	26.0
IV	160	64.0
Radioterapia adiuvante (solo per il retto)		
Si	33	46.5
No	38	53.5
Chemioterapia adiuvante		
5-FU	10	12.2
5-FU + FA	66	80.5
5-FU + FA + irinotecano	1	1.2
* Altro	5	6.1

[#] 10 pazienti non avevano lesioni metastatiche misurabili al momento dell'inserimento, 5 erano stati precedentemente trattati per la malattia metastatica, 1 non aveva una diagnosi istologica di adenocarcinoma colonrettale ed 1 aveva precedentemente sviluppato una seconda neoplasia

[§] Valutato secondo la scala TNM

^{*} 3 pazienti trattati con capecitabina, 1 con FUDR i.a., ed 1 con 5-FU + FA + oxaliplatino

Abbreviazioni: FU fluorouracile; FA, acido folico; FUDR, floxuridine.

4.2 GENOTIPIZZAZIONE DEI PAZIENTI

Tutti i 250 pazienti inclusi nello studio sono stati genotipizzati con successo per i vari polimorfismi sotto indagine. La caratterizzazione genotipica, impiegando come materiale di partenza il DNA genomico estratto dai campioni di sangue periferico raccolti dagli stessi pazienti, è stata effettuata tramite le procedure descritte in dettaglio nella sezione “Materiali e Metodi”. In Tabella 4.2, per ciascun marker genico, sono riportati il numero e la frequenza dei vari genotipi e la prevalenza dell’allele wild-type e polimorfico. Come si può osservare dai dati riassunti in tabella, le frequenze genotipiche ed alleliche ottenute sono concordi con quanto riportato in letteratura per la popolazione caucasica. Inoltre per tutte le varianti polimorfiche analizzate, la distribuzione dei genotipi rispetta l’equilibrio di Hardy-Weinberg ($p > 0.05$).

Tabella 4.2: Analisi dei vari polimorfismi nella popolazione oncologica d'indagine (n=250): numero e prevalenza dei vari genotipi e frequenze alleliche relative.

GENE	POLIMORFISMO	GENOTIPO N(%)			FREQUENZA ALLELICA (%)		HWE**
UGT1A1	*28 [TA ₆ >7]	*1/ *1 114 (45.6)	*1/ *28 114 (45.6)	*28/ *28 22 (8.8)	*1 68.4	*28 31.6	0.465
	*93 [-3156G>A]	GG 128 (51.2)	GA 105 (42.0)	AA 17 (6.8)	G 72.2	A 27.8	0.531
	*60 [-3279T>G]	TT 73 (29.2)	TG 132 (52.8)	GG 45 (18.0)	T 55.6	G 44.4	0.307
UGT1A7	*2 [387T>G]	TT 42 (16.8)	TG 116 (46.4)	GG 92 (36.8)	T 40.0	G 60.0	0.600
	*4 [622T>C]	TT 96 (38.4)	TC 111 (44.4)	CC 43 (17.2)	T 60.6	C 39.4	0.289
	*3 ^	0 96 (38.4)	1 113 (45.2)	2 41 (16.4)	-	-	-
UGT1A9	*22 [T ₉ >10]	*1/ *1 87 (34.8)	*1/ *22 120 (48.0)	*22/ *22 43 (17.2)	*1 58.8	*22 41.2	0.896
ABCB1	1236C>T	CC 85 (34.0)	CT 125 (50.0)	TT 40 (16.0)	C 59.0	T 41.0	0.695
	3435C>T	CC 67 (26.8)	CT 132 (52.8)	TT 51 (20.4)	C 53.2	T 46.8	0.376
	2677G>T/A	GG 86 (34.4)	GT-GA 121-4 (48.4-1.6)	TT-AT 35-4 (14.0-1.6)	G 59.4	T/A 39.0-1.6	0.602
	1199G>A	GG 212 (84.8)	GA 36 (14.4)	AA 2 (0.8)	G 92.0	A 8.0	0.661
	-129T>C	TT 231 (92.4)	TC 18 (7.2)	CC 1 (0.4)	T 96.0	C 4.0	0.327
	IVS4-25G>T	GG 153 (61.2)	GT 83 (33.2)	TT 14 (5.6)	G 77.8	T 22.2	0.582
	IVS9-44A>G	AA 84 (33.6)	AG 123 (49.2)	GG 43 (17.2)	A 58.2	G 41.8	0.897
	IVS13+24C>T	CC 71 (28.4)	CT 125 (50.0)	TT 54 (21.6)	C 53.4	T 46.6	1.000
	IVS14+38A>G	AA 73 (29.2)	AG 122 (48.8)	GG 55 (22.0)	A 53.6	G 46.4	0.799
ABCC1	2012G>T	GG 223 (89.2)	GT 27 (10.8)	TT 0 (0.0)	G 94.6	T 5.4	1.000
	1303C>A	CC 244 (97.6)	CA 6 (2.4)	AA 0 (0.0)	C 98.8	A 1.2	1.000
	2158G>A	GG 248 (99.2)	GA 2 (0.8)	AA 0 (0.0)	G 99.6	A 0.4	1.000
	1062T>C	TT 110 (44.0)	TC 118 (47.2)	CC 22 (8.8)	T 67.6	C 32.4	0.250
	1684C>T	CC 165 (66.0)	CT 72 (28.8)	TT 13 (5.2)	C 80.4	T 19.6	0.164
	4002G>A	GG 131 (52.4)	GA 105 (42.0)	AA 14 (5.6)	G 73.4	A 26.6	0.261
	IVS11-48C>T	CC 171 (68.4)	CT 76 (30.4)	TT 3 (1.2)	C 83.6	T 16.4	0.107
	IVS18-30G>C	GG 171 (68.4)	GC 67 (26.8)	CC 12 (4.8)	G 81.8	C 18.2	0.134
	-260G>C	GG 164 (65.6)	GC 74 (29.6)	CC 12 (4.8)	G 80.4	C 19.6	0.319

	IVS30+18G>A	GG 171 (68.4)	GA 74 (29.6)	AA 5 (2.0)	G 83.2	A 16.8	0.496
ABCC2	-24C>T	CC 165 (66.0)	CT 76 (30.4)	TT 9 (3.6)	C 81.2	T 18.8	1.000
	1249G>A	GG 141 (56.4)	GA 94 (37.6)	AA 15 (6.0)	G 75.2	A 24.8	1.000
	3972C>T	CC 111 (44.4)	CT 112 (44.8)	TT 27 (10.8)	C 66.8	T 33.2	1.000
	-1549G>A	GG 81 (32.4)	GA 123 (49.2)	AA 46 (18.4)	G 57.0	A 43.0	1.000
	-1019A>G	AA 76 (30.4)	AG 128 (51.2)	GG 46 (18.4)	A 56.0	G 44.0	0.608
	IVS26-34T>C	TT 199 (79.6)	TC 48 (19.2)	CC 3 (1.2)	T 89.2	C 10.8	1.000
	-1023G>A	GG 192 (76.8)	GA 55 (22.0)	AA 3 (1.2)	G 87.8	A 12.2	1.000
	4544G>A	GG 200 (80.0)	GA 47 (18.8)	AA 3 (1.2)	G 89.4	A 10.6	0.745
	3662T>A	TT 199 (79.6)	TA 48 (19.2)	AA 3 (1.2)	T 89.2	A 10.8	1.000
	IVS23+56C>T	CC 108 (43.2)	CT 114 (45.6)	TT 28 (11.2)	C 66.0	T 34.0	0.888
ABCG2	421C>A	CC 208 (83.2)	CA 41 (16.4)	AA 1 (0.4)	C 91.4	A 8.6	1.000
	34G>A	GG 228 (91.2)	GA 21 (8.4)	AA 1 (0.4)	G 95.4	A 4.6	0.411
	-19572/19569 CTCAdel	+ / + 41 (16.4)	+ / - 131 (52.4)	- / - 78 (31.2)	+ 42.6	- 57.4	0.301
	-15994G>A	GG 174 (69.6)	GA 68 (27.2)	AA 8 (3.2)	G 83.2	A 16.8	0.652
	-15622C>T	CC 130 (52.0)	CT 99 (39.6)	TT 21 (8.4)	C 71.8	T 28.2	0.755
	16702G>A	GG 227 (90.8)	GA 23 (9.2)	AA 0 (0.0)	G 95.4	A 4.6	1.000
	1143C>T	CC 150 (60.0)	CT 87 (34.8)	TT 13 (5.2)	C 77.4	T 22.6	1.000
SLCO1B1	521T>C	TT 186 (74.4)	TC 55 (22.0)	CC 9 (3.6)	T 85.4	C 14.6	0.073
	388A>G	AA 86 (34.4)	AG 117 (46.8)	GG 47 (18.8)	A 57.8	G 42.2	0.519
	-11187G>A	GG 208 (83.2)	GA 42 (16.8)	AA 0 (0.0)	G 91.6	A 8.4	0.232
	*15 ^	0 194 (77.6)	1 51 (20.4)	2 5 (2.0)	-	-	-
	*17 ^	0 244 (97.6)	1 6 (2.4)	2 0 (0.0)	-	-	-
CYP3A4	*1B [-392A>G]	AA 237 (94.8)	AG 13 (5.2)	GG 0 (0.0)	A 97.4	G 2.6	1.000
CYP3A5	*3 [6986A>G]	GG 213 (85.2)	GA 37 (14.8)	AA 0 (0.0)	G 92.6	A 7.4	0.375

** Exact P-value per Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) (P>0.05)

^ numero di alleli che presenta il paziente

4.3 LINKAGE DISEQUILIBRIUM E DETERMINAZIONE APLOTIPICA

Per alcuni geni, ovvero UGT1A, ABCB1, ABCC2 e ABCG2, ove esistono evidenze in letteratura (vedi Introduzione), si sono studiate le possibili relazioni di LD, descritte dal coefficiente di Lewontin's (D') e dal coefficiente di correlazione (r^2), e si sono poi determinati statisticamente i più comuni aplotipi definendo così per ciascun paziente il relativo diplotipo.

4.3.1 UGT1A

Per UGT1A si sono investigati gli accoppiamenti di LD considerando tutti i polimorfismi introdotti nell'analisi farmacogenetica di questo lavoro di tesi ovvero UGT1A1 (*28, *60, *93), UGT1A7 (*2 [387T>G], *4 [622T>C]) e UGT1A9 (*22). In Figura 4.1 sono rappresentati graficamente i rapporti di linkage tra i vari markers analizzati e sono riportati i valori di D' e r^2 ; l'intensità del colore così come i valori dei coefficienti indicano il grado di significatività statistica dell'associazione. Come si può constatare dalle immagini si è riscontrato un elevato livello di LD fra tutte le varianti dell'UGT1A analizzate ed in particolare fra i siti polimorfici di ciascuna isoforma. Ad esempio le varianti UGT1A1*28, *60 e *93 sono strettamente associate fra loro ($0.8927 < D' < 1.0000$; $0.5032 < r^2 < 0.6782$) così come i due alleli dell'isoforma UGT1A7 387T>G e 622T>C ($D' = 0.9720$, $r^2 = 0.4026$). Le varianti di UGT1A7 e UGT1A9 sono più associate tra loro ($0.8297 < D' < 0.9233$; $0.3022 < r^2 < 0.8278$) rispetto che con quelle di UGT1A1 ($0.6891 < D' < 0.8700$; $0.1822 < r^2 < 0.4658$), forse a causa della prossimità dei loci che le codificano. Effettuato lo studio di LD si è proseguito con la determinazione statistica dei più comuni aplotipi la cui frequenza allelica è riportata in Tabella 4.3 (A). L'aplotipo più frequente (34.2%) è risultato essere quello con tutti i polimorfismi nello stato wild-type eccetto per UGT1A9*22 presente nello stato variante (tutte forme associate ad elevata funzionalità). Segue per prevalenza (23.2%) l'aplotipo con tutti i markers genici nella forma polimorfica tranne per UGT1A9*22 presente nella forma wild-type (tutte forme a bassa funzionalità). Queste due combinazioni aplotipiche, oltre ad una buona prevalenza, possiedono, quindi, anche un significato fenotipico particolarmente rilevante. Al terzo posto per frequenza (14.4%) troviamo, infine, l'aplotipo costituito dalla forma wild-type per i polimorfismi di UGT1A1, UGT1A7 622T>C e UGT1A9*22 e variante per UGT1A7 387T>G. Di questi tre aplotipi si è valutata la distribuzione nella popolazione d'indagine andando a considerare il numero di alleli presentati da ciascun paziente, Tabella 4.3 (B).

Figura 4.1: Rappresentazione grafica dei rapporti di Linkage Disequilibrium (LD) fra i polimorfismi dell' UGT1A. Coefficiente di Lewontin's D' (A); coefficiente di correlazione r^2 (B).

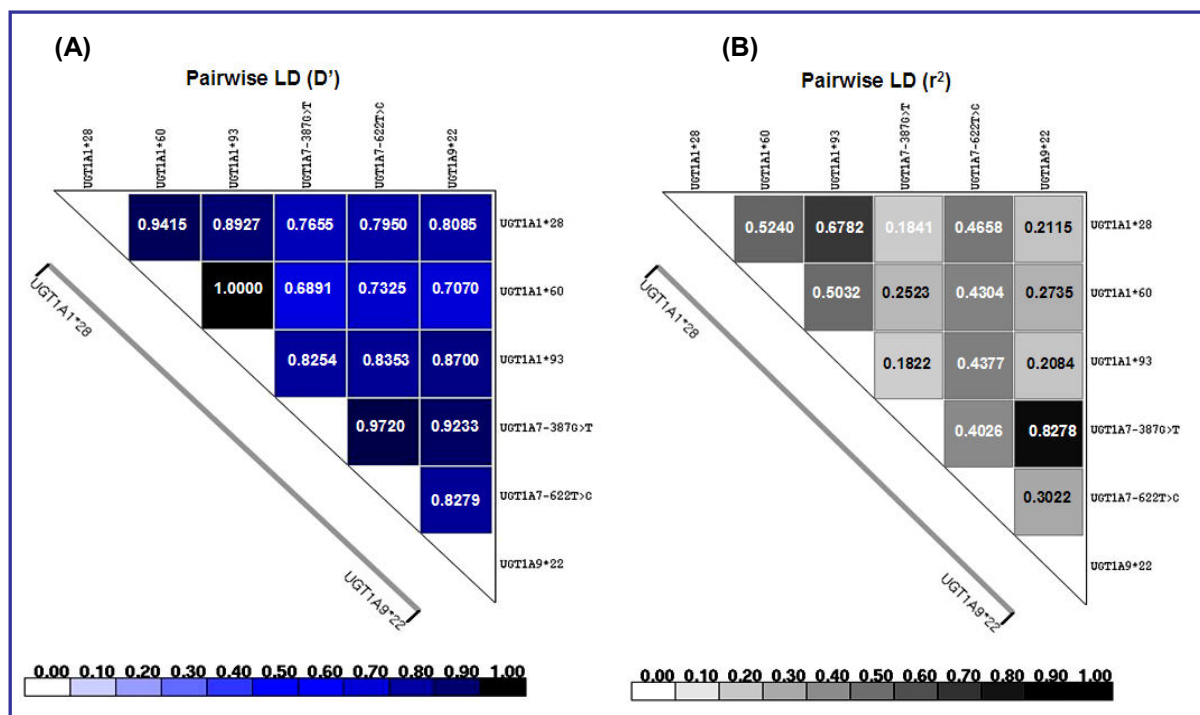


Tabella 4.3: Struttura dei più comuni aplotipi di UGT1A (A) e relativa frequenza nella popolazione d'indagine (N=250) (B)

(A)

	UGT1A1			UGT1A7		UGT1A9	%
	*93	*60	*28	387T>G	622T>C	*22	
I	G	T	*1	T	T	*22	34.2
II	A	G	*28	G	C	*1	23.2
III	G	T	*1	G	T	*1	14.4
IV	G	G	*1	G	T	*1	4.6
V	G	G	*1	G	C	*1	3.9
VI	G	T	*1	G	C	*1	3.6
VII	G	G	*28	G	C	*1	3.4
VIII	G	G	*1	T	T	*22	2.1
IX	G	T	*1	G	C	*22	1.4
X	G	G	*1	G	C	*1	1.2
XI	G	G	*28	T	T	*22	0.9
XII	G	T	*1	T	T	*1	0.9
XIII	A	G	*28	G	T	*1	0.7
XIV	G	T	*1	G	T	*22	0.7
XV	A	G	*28	T	T	*22	0.7

In tabella sono riportati solo gli aplotipi con una frequenza >0.5

(B)

UGT1A	N (%)
Aplotipo I [^]	
0	110 (44.0)
1	109 (43.6)
2	31 (12.4)
Aplotipo II [^]	
0	147 (58.8)
1	90 (36.0)
2	13 (5.2)
Aplotipo III [^]	
0	182 (72.8)
1	64 (25.6)
2	4 (1.6)

[^] numero di alleli

4.3.2 ABCB1

Per il gene ABCB1 è stato effettuato lo studio di LD fra tre polimorfismi: 1236C>T, 3435C>T e 2677G>T/A. Per quanto riguarda il marker 2677G>T/A, l'allele variante T e A sono stati considerati insieme in quanto presentano il medesimo impatto fenotipico sulla funzionalità della proteina. In Figura 4.2 è riportata la rappresentazione grafica delle associazioni di LD riscontrate, descritte dai valori di D' e r^2 . Come si può constatare dalla forte intensità di colore dei riquadri e dalla stima dei coefficienti tendenti al valore unitario, in accordo con i dati di letteratura, esiste un elevato grado di associazione fra tutte e tre le varianti analizzate ($0.7938 < D' < 0.9231$; $0.4978 < r^2 < 0.8381$). Terminato lo studio di LD, sono stati, quindi, determinati i più comuni aplotipi la cui struttura e prevalenza allelica è riportata in Tabella 4.4 (A). L'aplotipo più diffuso (47.8%) è risultato essere quello costituito dalla forma wild-type delle tre varianti geniche, mentre il secondo per frequenza (36.6%) è risultato quello con lo stato polimorfico per tutti e tre i markers genici considerati. Di questi due aplotipi si è valutata la distribuzione nella popolazione oncologica d'indagine andando a considerare il numero di alleli presentati da ciascun paziente, Tabella 4.4 (B).

Figura 4.2: Rappresentazione grafica dei rapporti di Linkage Disequilibrium (LD) fra i polimorfismi di ABCB1. Coefficiente di Lewontin's D' (A); coefficiente di correlazione r^2 (B).

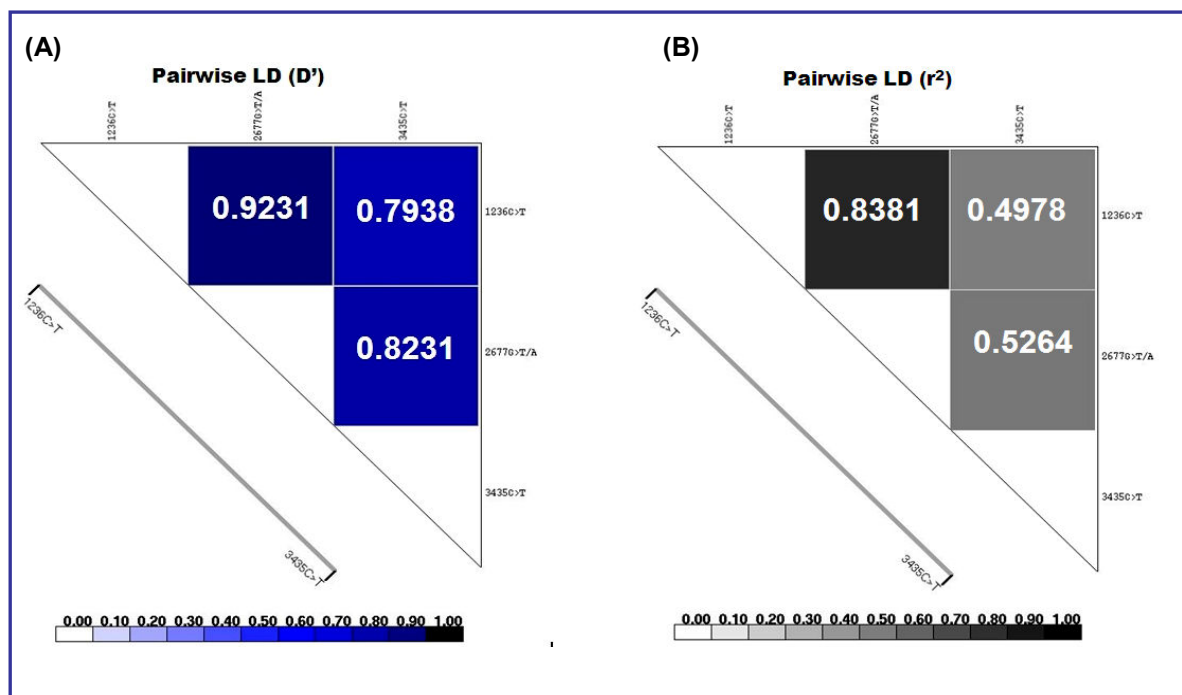


Tabella 4.4: Struttura dei più comuni aplotipi di ABCB1 (A) e relativa frequenza nella popolazione d'indagine (N=250) (B).

(A)

	1236C>T	2677G>T/A**	3435C>T	%
I	C	G	C	47.8
II	T	T	T	36.6
III	C	G	T	9.4
IV	T	T	C	2.2
V	T	G	C	2.0
VI	C	T	C	1.2
VII	C	T	T	0.6

In tabella sono riportati solo gli aplotipi con una frequenza >0.5

** L'allele variante T e A sono stati accomunati in quanto manifestano lo stesso impatto fenotipico

(B)

ABCB1	N (%)
Aplotipo I ^	
0	65 (26.0)
1	131 (52.4)
2	54 (21.6)
Aplotipo II ^	
0	97 (38.8)
1	123 (49.2)
2	30 (12.0)

numero di alleli

4.3.3 ABCC2

Per il gene ABCC2 si sono investigati i relativi rapporti di correlazione fra sei polimorfismi: -24C>T, 1249G>A, 3972C>T, -1549G>A, -1019A>G e IVS26-34T>C. In Figura 4.3 sono presenti i grafici e i valori dei coefficienti D' e r^2 che descrivono il grado di associazione riscontrato. In accordo con i dati bibliografici, si è rilevato un buon livello di linkage fra tutte le variabili investigate ($0.7929 < D' < 1.000$; $0.0251 < r^2 < 0.9440$). La stima piuttosto bassa del coefficiente r^2 per il marker IVS26-34T>C ($0.0251 < r^2 < 0.1118$) è probabilmente dovuta alla sua scarsa prevalenza nella popolazione esaminata (vedi Tabella 4.2). In Tabella 4.5 (A) sono riportati i più comuni aplotipi che sono stati identificati, con relativa struttura e frequenza allelica. L'aplotipo più diffuso (28.8%) è risultato essere quello costituito dalla forma wild-type di tutte le varianti geniche considerate. Segue per frequenza (23.2%) l'aplotipo caratterizzato dalla forma polimorfica per 1249G>A e dallo stato wild-type per gli altri cinque siti genici analizzati. Infine, al terzo posto per prevalenza (18.6%) troviamo l'aplotipo quasi complementare al precedente costituito dalla forma variante per -24C>T, 3972C>T, -1549G>A, e -1019A>G e dallo stato wild-type per 1249G>A e IVS26-34T>C. Dei tre aplotipi più diffusi si è valutata la distribuzione nel campione d'indagine andando a considerare il numero di alleli presentati da ciascun paziente, Tabella 4.5 (B).

Figura 4.3: Rappresentazione grafica dei rapporti di Linkage Disequilibrium (LD) fra i polimorfismi di ABCC2. Coefficiente di Lewontin's D' (A); coefficiente di correlazione r² (B).

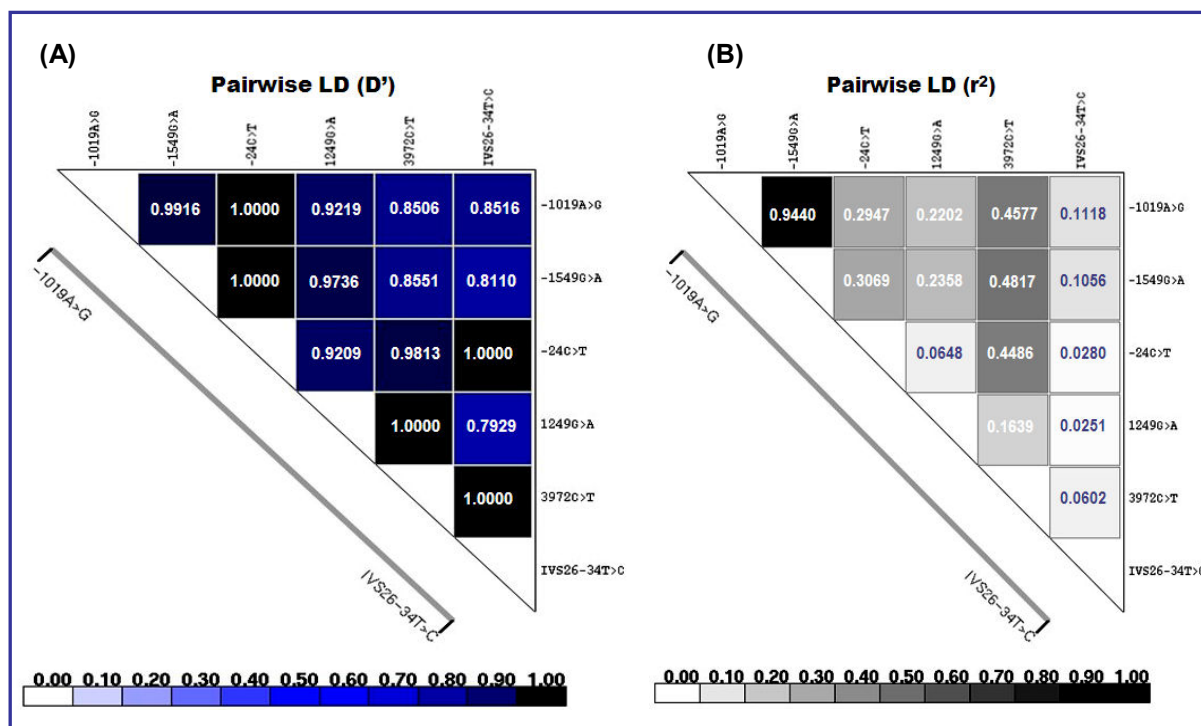


Tabella 4.5: Struttura dei più comuni aplotipi di ABCC2 (A) e relativa frequenza nella popolazione d'indagine (N=250) (B).

(A)

	-1019A>G	1249G>A	-1549G>A	-24C>T	3972C>T	IVS26-34T>C	%
I	A	G	G	C	C	T	28.8
II	A	A	G	C	C	T	23.2
III	G	G	A	T	T	T	18.6
IV	G	G	A	C	T	T	12.2
V	G	G	A	C	C	C	9.4
VI	A	G	G	C	T	T	2.4
VII	G	G	A	C	C	T	2.4
VIII	A	G	G	C	C	C	0.8
IX	G	A	G	C	C	T	0.8
X	A	A	G	C	C	C	0.6

In tabella sono riportati solo gli aplotipi con una frequenza >0.5

(B)

ABCC2	N (%)
Aplotipo I ^	
0	121 (48.4)
1	114 (45.6)
2	15 (6.0)
Aplotipo II ^	
0	145 (58.0)
1	94 (37.6)
2	11 (4.4)
Aplotipo III ^	
0	166 (66.4)
1	75 (30.0)
2	9 (3.6)

^ numero di alleli

4.3.4 ABCG2

Per il gene ABCG2 è stata effettuata l'analisi degli accoppiamenti di LD fra tutti e sette i polimorfismi genici introdotti nello studio di farmacogenetica della tesi: 421C>A, 34G>A, -19572/19569 CTCAdel, -15994G>A, -15622C>T, 16702G>A e 1143C>T. In Figura 4.4 sono rappresentati graficamente i rapporti di LD tra i vari markers analizzati e sono riportati i valori di D' e r^2 . Come si può constatare dalle immagini riportate nella figura, l'intensità del colore dei riquadri risulta globalmente variabile suggerendo una certa eterogeneità nel grado di associazione fra i vari siti polimorfici investigati. In maniera concorde, anche i valori dei due coefficienti D' e r^2 presentano un range di distribuzione piuttosto ampio ($0.0386 < D' < 1.0000$; $0.0001 < r^2 < 0.5939$). L'esito dell'analisi è probabilmente influenzato anche dalla presenza di alcuni polimorfismi relativamente poco diffusi nella popolazione d'indagine come 421C>A, 34G>A e 16702G>A (vedi Tabella 4.2). Considerata l'eterogeneità dei dati ottenuti è difficile trarre delle conclusioni generali; ad ogni modo si può osservare che -15994G>A è il marker genico che più uniformemente presenta un buon grado di associazione con tutte le varianti analizzate ($0.6117 < D' < 1.0000$; $0.0036 < r^2 < 0.1499$). Terminato lo studio di LD si è proceduto con la determinazione statistica dei più comuni aplotipi la cui struttura e frequenza allelica è riassunta in Tabella 4.6 (A). L'aplotipo più diffuso (30.4%) è risultato essere quello costituito dalla forma wild-type di tutte le sette varianti geniche considerate. Il secondo aplotipo per prevalenza (19.2%) è quello con la forma wild-type di tutte le variante ad eccezione di 421C>A, -15622C>T e -19572/19569 CTCAdel presenti nello stato polimorfico. Infine segue per frequenza (15.4%) l'aplotipo costituito dalla forma wild-type di tutte le varianti ad eccezione di -15994G>A e -19572/19569 CTCAdel presenti nello stato polimorfico. Dei tre aplotipi più diffusi si è valutata la distribuzione nel campione d'indagine andando a considerare il numero di alleli presentati da ciascun paziente, Tabella 4.6 (B).

Figura 4.4: Rappresentazione grafica dei rapporti di Linkage Disequilibrium (LD) fra i polimorfismi di ABCG2. Coefficiente di Lewontin's D' (A); coefficiente di correlazione r^2 (B).

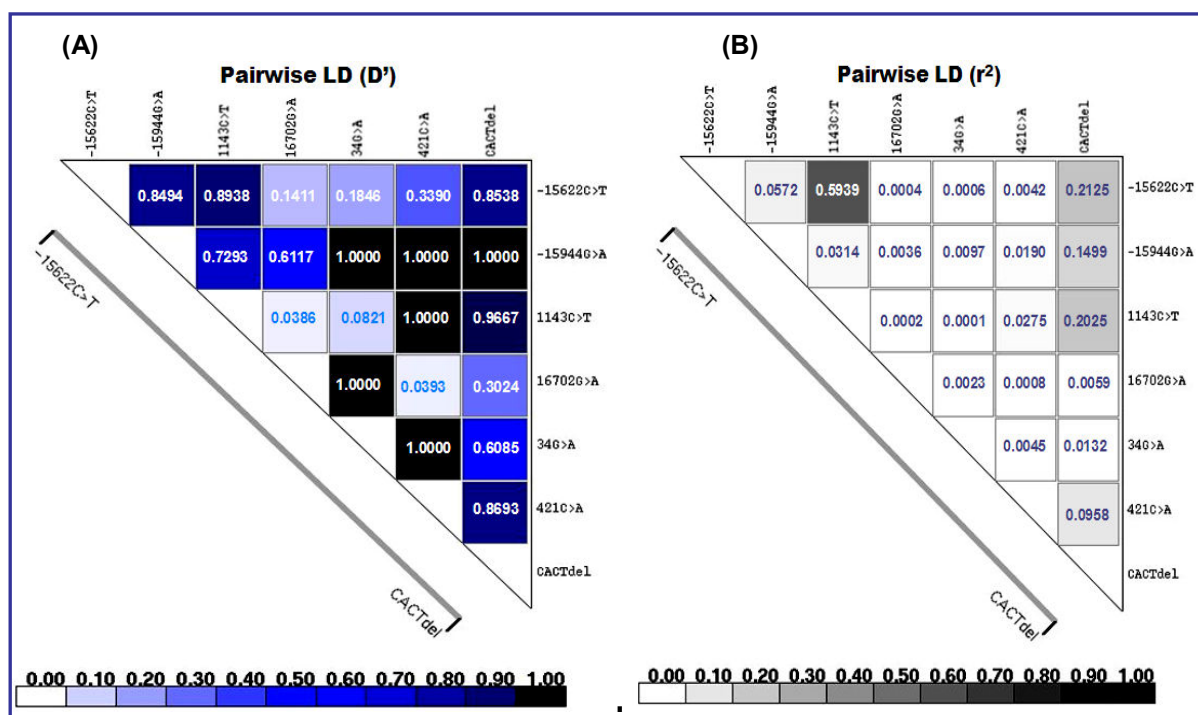


Tabella 4.6: Struttura dei più comuni aplotipi di ABCG2 (A) e relativa frequenza nella popolazione d'indagine (N=250) (B).

(A)

	1143C>T	-15622C>T	-15994G>A	16702G>A	34G>A	421C>A	CTCA del	%
I	C	C	G	G	G	C	(+)	30.4
II	T	T	G	G	G	C	(-)	19.2
III	C	C	A	G	G	C	(-)	15.4
IV	C	C	G	G	G	C	(-)	9.6
V	C	C	G	G	G	A	(+)	6.6
VI	C	T	G	G	G	C	(-)	5.8
VII	C	C	G	G	A	C	(-)	3.6
VIII	C	C	G	A	G	C	(+)	3.2
IX	C	T	G	G	G	A	(+)	1.2
X	T	C	G	G	G	C	(-)	1.2
XI	T	T	G	A	G	C	(-)	0.8

In tabella sono riportati solo gli aplotipi con una frequenza >0.5

(B)

ABCG2	N (%)
Aplotipo I[^]	
0	121 (48.4)
1	106 (42.4)
2	23 (9.2)
Aplotipo II[^]	
0	163 (65.2)
1	78 (31.2)
2	9 (3.6)
Aplotipo III[^]	
0	179 (71.6)
1	65 (26.0)
2	6 (2.4)

[^] numero di alleli

4.4 VALUTAZIONE CLINICA DELLA TOLLERANZA AL TRATTAMENTO

Per valutare a livello clinico la tolleranza al trattamento chemioterapico, seguendo le modalità descritte nella sezione “Materiali e Metodi”, è stato determinato e registrato, per ognuno dei 250 pazienti inclusi nello studio, il grado massimo di tossicità sviluppato durante ciascun ciclo di terapia. Per l’analisi dei dati sono considerati, in particolare, gli effetti tossici esibiti dai pazienti durante il primo ciclo di terapia (tossicità acuta) e durante l’intero corso del trattamento (tossicità cumulativa). Inoltre sono state valutate, in maniera specifica, sia le manifestazioni avverse di tipo ematologico che quelle di tipo non ematologico. I dati raccolti sono riassunti in Tabella 4.7. Globalmente la terapia è risultata essere ben tollerata dai pazienti. Una tossicità severa (grado 3 e 4), sia ematologica che non, è stata registrata durante il primo ciclo di trattamento in 22 soggetti su 250 (8.8%) e durante l’intero corso della chemioterapia in 68 soggetti su 250 (27.2%). La più frequente tossicità ematologica (Grado 1-4) riscontrata è stata la neutropenia: in 40 pazienti (16%) durante il primo ciclo e in 91 pazienti (36.4%) durante l’intero corso della chemioterapia. Gli effetti tossici non ematologici (Grado 1-4) predominanti sono stati: diarrea (69 pazienti, 27.6% durante il primo ciclo e 115 pazienti, 46% durante l’intero corso della chemioterapia), nausea (57 pazienti, 22.8% durante il primo ciclo e 103 pazienti, 41.2% durante l’intero corso della chemioterapia), vomito (27 pazienti, 10.8% durante il primo ciclo e 57 pazienti, 22.8% durante l’intero corso della chemioterapia) e/o astenia (25 pazienti, 10% durante il primo ciclo e 60 pazienti, 24% durante l’intero corso della chemioterapia). Quindi è la tossicità di tipo non ematologico a caratterizzare maggiormente questi pazienti, soprattutto se si considera l’intero corso della terapia.

Tabella 4.7. Prevalenza dei più comuni eventi tossici ematologici e non ematologici (grado 1-4 e 3-4), sviluppati dai pazienti (N=250) durante il primo ciclo di terapia e durante l'intero corso del trattamento.

EFFETTI TOSSICI	PRIMO CICLO				INTERO CORSO DELLA TERAPIA			
	GRADO 1-4		GRADO 3-4		GRADO 1-4		GRADO 3-4	
	Totale	%	Totale	%	Totale	%	Total	%
NON EMATOLOGICI								
Diarrea	69	27.6	6	2.4	115	46.0	21	8.4
Nausea	57	22.8	2	0.8	103	41.2	4	1.6
Vomito	27	10.8	2	0.8	57	22.8	7	2.8
Astenia	25	10.0	1	0.4	60	24.0	3	1.2
Alopecia	8	3.2	1	0.4	35	14.0	8	3.2
Mucositi	17	6.8	0	0.0	60	24.0	7	2.8
Anoressia	3	1.2	0	0.0	8	3.2	0	0.0
Infezioni senza una concomitante neutropenia G3-4	2	0.8	1	0.4	8	3.2	3	1.2
EMATOLOGICI								
Anemia	33	13.2	1	0.4	59	23.6	3	1.2
Neutropenia	40	16.0	11	4.4	91	36.4	35	14.0
Leucopenia	27	10.8	2	0.8	61	24.4	15	6.0
Febbre con concomitante neutropenia G3-4	2	0.8	2	0.8	7	2.8	3	1.2
Trombocitopenia	2	0.8	0	0.0	8	3.2	0	0.0

4.5 POLIMORFISMI GENICI E TOSSICITA'

In questa parte del lavoro è stato analizzato il ruolo dei vari polimorfismi genici e della loro combinazione atipica nel predisporre il paziente allo sviluppo di fenomeni tossici a seguito di chemioterapia con FOLFIRI. In particolare è stata valutata l'associazione statistica tra i markers genici e il grado massimo di tossicità sviluppato dai pazienti durante il primo ciclo di terapia e durante l'intero corso del trattamento, valutando separatamente le reazioni avverse di tipo ematologico e non ematologico. Particolare attenzione è stata posta allo studio specifico della neutropenia e della diarrea che, oltre a caratterizzare la terapia con irinotecano, rappresentano anche le tossicità più frequenti nella popolazione d'indagine.

Per tutte le associazioni investigate è stata effettuata prima un'analisi univariata allo scopo di selezionare le varianti geniche ed atipiche da inserire poi nella successiva analisi multivariata assieme alle caratteristiche clinico-demografiche dei pazienti. Le procedure statistiche impiegate sono descritte nella sezione "Materiali e Metodi". Nella creazione dei modelli di regressione logistica si sono impiegate prima le singole varianti polimorfiche e poi si sono sostituite queste con il relativo atipo.

4.5.1 TOSSICITÀ EMATOLOGICA E NEUTROPENIA

Innanzitutto, tramite Test Esatto di Fisher, si sono selezionati i markers genetici da inserire nella successiva analisi multivariata (cut off $p < 0.1$): lo studio è stato effettuato sia per la tossicità ematologica che specificatamente per la neutropenia, andando a considerare sia gli effetti tossici acuti che cumulativi. I markers individuati sono riportati in Tabella 4.8 e 4.9.

Successivamente, l'analisi multivariata ha permesso di identificare tra questi, alcuni determinanti genici che sono risultati indipendentemente predittivi, e che sono riassunti in Tabella 4.10. In particolare, per quanto riguarda le manifestazioni avverse di tipo ematologico durante il primo ciclo di terapia (Tabella 4.10-A), i pazienti che presentano due alleli UGT1A7*3 sono più a rischio di sviluppare tossicità severa rispetto ai soggetti non portatori del medesimo allele (OR=4.13 95%CI: 1.03-16.50, $p=0.04$). Il modello sviluppato comprende, inoltre, altri due markers atipici, ovvero ABCC2 atipo II (OR=9.14 95%CI: 1.36-61.26, $p=0.02$) e ABCG2 atipo I (OR=5.67 95%CI: 1.24-25.93, $p=0.03$); in entrambi i casi gli individui che possiedono entrambi gli alleli varianti risultano avere un maggior rischio di tossicità G3-G4 rispetto a chi non li possiede. Per quanto riguarda gli effetti tossici ematologici durante l'intero corso della terapia, si sono individuati tre fattori significativi

(Tabella 4.10-B): il sesso, con un ruolo protettivo attribuito al sesso maschile, il polimorfismo ABCC1 1303C>A, con un aumentato rischio per i pazienti con genotipo eterozigote 1303CA rispetto a quelli con genotipo wild-type 1303CC ed, infine, la variante genica UGT1A9*22, con una maggior probabilità di eventi avversi per i soggetti con genotipo *22/*22 rispetto quelli con genotipo *1/*1. Il modello finale, in alternativa al polimorfismo UGT1A9*22, può comprendere l'aplotipo I di UGT1A, associato ad un maggior rischio di tossicità severa in presenza di almeno un allele variante.

Per quanto riguarda i determinanti predittivi di neutropenia, questi sono quasi totalmente sovrapponibili a quelli identificati per la tossicità ematologica, sia per quanto riguarda il primo ciclo di terapia che l'intero corso del trattamento (Tabella 4.10- C,D). Questo dato è concorde al fatto che la neutropenia rappresenta la forma principale di tossicità ematologica nel nostro campione di studio. L'unica eccezione è rappresentata dal sesso maschile che non sembra essere correlato allo sviluppo di neutropenia mentre, invece, è un fattore protettivo verso l'insorgenza di reazioni avverse di tipo ematologico durante l'intero corso di terapia.

Tabella 4.8: Polimorfismi e severa tossicità ematologica (G3-G4) durante il primo ciclo di terapia (A) e l'intero corso del trattamento (B). Markers selezionati dall'analisi univariata (cut-off p<0.1).

A) TOSSICITA' EMATOLOGICA – primo ciclo di terapia

SNP	G3-G4/ Totale				
	N°	%	‡OR	(95% CI)	P
UGT1A1*28					
*1/ *1	2/114	1.8	§1		
*1/ *28	7/114	6.1	3.66	0.74-18.04	0.17
*28/ *28	3/22	13.6	8.84	1.38-56.49	0.03
UGT1A1*93 [3156G>A]					
GG	3/128	2.3	§1		
GA	8/105	7.6	3.44	0.89-13.30	0.07
AA	1/17	5.9	2.60	0.25-26.57	0.40
GA + AA	9/122	7.4	3.32	0.88-12.57	0.08
UGT1A1*60 [3279T>G]					
TT	1/73	1.4	§1		
TG	6/132	4.5	3.43	0.40-29.06	0.43
GG	5/45	11.1	9.00	1.01-79.78	0.03
UGT1A7*3					
0	4/96	4.2	§1		
1	2/113	1.8	0.41	0.07-2.31	0.42
2	6/41	14.6	3.94	1.05-14.82	0.06
ABCC2 aplotipo II					
0	8/145	5.5	§1		
1	2/94	2.1	0.37	0.08-1.79	0.32
2	2/11	18.2	3.81	0.70-20.63	0.15
0+1 [§] vs 2	10/239	4.2	5.09	0.97-26.72	0.09
ABCG2 aplotipi I					
0	5/121	4.1	§1		
1	4/106	3.8	0.91	0.24-3.48	1.0
2	3/23	13.0	3.48	0.77-15.73	0.12
0+1 [§] vs 2	9/227	4.0	3.63	0.91-14.51	0.09

‡ calcolato con Fisher exact test

§ reference category

^ numero di alleli portati dal paziente

B) TOSSICITA' EMATOLOGICA – intero trattamento

SNP	G3-G4/ Totale				
	N°	%	‡OR	(95% CI)	P
UGT1A9*22					
*1/ *1	19/87	21.8	§1		
*1/ *22	15/120	12.5	0.51	0.24-1.07	0.09
*22/ *22	3/43	7.0	0.27	0.07-0.96	0.04
UGT1A aplotipo I					
0	23/110	20.9	§1		
1	12/109	11.0	0.47	0.22-0.99	0.06
2	2/31	6.4	0.26	0.06-1.17	0.07
1+2	14/140	10.0	0.42	0.20-0.86	0.02
UGT1A aplotipo III					
0	23/182	12.6	§1		
1	12/64	18.7	1.59	0.74-3.43	0.30
2	2/4	50.0	6.91	0.93-51.52	0.09
ABCB1 IVS14+38A>G					
AA	15/73	20.5	§1		
GA	13/122	10.7	0.46	0.21-1.04	0.06
GG	9/55	16.4	0.76	0.30-1.89	0.65
ABCC1 IVS18-30G>C					
GG	24/171	14.0	§1		
GC	8/67	11.9	0.83	0.35-1.95	0.83
CC	5/12	41.7	4.38	1.28-14.91	0.03
ABCC1 1303C>A					
CC	34/244	13.9	§1		
CA	3/6	50.0	6.18	1.20-31.88	0.04
ABCC1 1684C>T					
CC	22/165	13.3	§1		
CT	10/72	13.9	1.05	0.47-2.35	1.00
TT	5/13	38.5	4.06	1.22-13.55	0.03
ABCC2 aplotipo III					
0	20/166	12.0	§1		
1	15/75	20.0	1.83	0.88-3.80	0.12
2	2/9	22.2	2.09	0.40-10.75	0.32
1+2	17/84	20.2	1.85	0.91-3.76	0.09
ABCG2 16702G>A					
GG	30/227	13.2	§1		
GA	7/23	30.4	2.87	1.09-7.56	0.06

Tabella 4.9: Polimorfismi e severa neutropenia durante il primo ciclo di terapia (A) e l'intero corso (G3-G4) del trattamento (B). Markers selezionati dall'analisi univariata (cut-off p<0.1).

A) NEUTROPENIA – primo ciclo di terapia

SNP	G3-G4/ Totale				
	N°	%	‡OR	(95% CI)	P
UGT1A1*28					
*1/ *1	2/114	1.8	§1		
*1/ *28	6/114	5.3	3.11	0.61-15.76	0.28
*28/ *28	3/22	13.6	8.84	1.38-56.49	0.03
UGT1A1*60 [3279T>G]					
TT	1/73	1.4	§1		
TG	6/132	4.5	3.43	0.40-29.06	0.43
GG	4/45	8.9	7.02	0.76-65.01	0.07
UGT1A7*3					
0	4/96	4.2	§1		
1	2/113	1.8	0.41	0.07-2.32	0.42
2	5/41	12.2	3.19	0.81-12.58	0.13
0+1 [§] vs 2	6/209	2.9	4.70	1.36-16.22	0.02
ABCC2 aplotipo II					
0	7/145	4.8	§1		
1	2/94	2.1	0.43	0.09-2.11	0.49
2	2/11	18.2	4.38	0.79-24.23	0.12
0+1 [§] vs 2	9/239	3.8	5.68	1.07-30.20	0.08
ABCG2 aplotipo I					
0	5/121	4.1	§1		
1	3/106	2.8	0.68	0.16-2.90	0.73
2	3/23	13.0	3.48	0.77-15.73	0.12
0+1 [§] vs 2	8/227	3.5	4.11	1.01-16.72	0.07

‡ calcolato con Fisher exact test

§ reference category

^ numero di alleli portati dal paziente

B) NEUTROPENIA – intero trattamento

SNP	G3-G4/ Totale				
	N°	%	‡OR	(95% CI)	P
UGT1A9*22					
*1/ *1	17/87	19.5	§1		
*1/ *22	15/120	12.5	0.59	0.28-1.26	0.18
*22/ *22	3/43	7.0	0.31	0.09-1.12	0.07
UGT1A aplotipi I					
0	21/110	19.1	§1		
1	12/109	11.0	0.52	0.24-1.13	0.13
2	2/31	6.5	0.29	0.06-1.32	0.11
1+2	14/140	10.0	0.47	0.23-0.98	0.04
ABCB1 IVS13+24C>T					
CC	14/71	19.7	§1		
CT	12/125	9.6	0.43	0.19-1.00	0.05
TT	9/54	16.7	0.81	0.32-2.05	0.82
ABCB1 IVS14+38A>G					
AA	15/73	20.5	§1		
GA	11/122	9.0	0.38	0.17-0.89	0.03
GG	9/55	16.4	0.76	0.30-1.89	0.65
GA+GG	20/177	11.3	0.49	0.24-1.03	0.07
ABCC1 IVS18- 30G>C					
GG	23/171	13.5	§1		
GC	8/67	11.9	0.87	0.37-2.06	0.83
CC	4/12	33.3	3.22	0.90-11.55	0.08
ABCC1 1303C>A					
CC	32/244	13.1	§1		
CA	3/6	50.0	6.63	1.28-34.27	0.04
ABCC1 1684C>T					
CC	21/165	12.7	§1		
CT	10/72	13.9	1.11	0.49-2.49	0.84
TT	4/13	30.8	3.05	0.86-10.79	0.09
ABCG2 16702G>A					
GG	28/227	12.3	§1		
GA	7/23	30.4	3.11	1.18-8.22	0.03

Tabella 4.10. Analisi multivariata effettuata per valutare l'associazione fra le varianti geniche/aplotipiche e il rischio di sviluppare tossicità severa (G3-G4) ematologica e neutropenia. Nel modello di regressione logistica sono state inclusi i markers genici e le caratteristiche clinico-demografiche (età, sesso) selezionate dall'analisi univariata (P<0.1)

Markers genici	Estimate (SE)	OR (95% CI)	p-value
(A) SEVERA TOSSICITA' EMATOLOGICA durante il 1 ciclo di terapia			
UGT1A7*3 [^] 2 (ref. [^] 0)	1.418 (0.707)	4.13 (1.03-16.50)	0.04
ABCC2 aplotipo II [^] 2 (ref. [^] 0 or [^] 1)	2.213 (0.971)	9.14 (1.36-61.26)	0.02
ABCG2 aplotipo I [^] 2 (ref. [^] 0 or [^] 1)	1.735 (0.776)	5.67 (1.24-25.93)	0.03
<i>P= 0.001 per il modello di multivariata</i>			
(B) SEVERA TOSSICITA' EMATOLOGICA durante l'intero corso del trattamento			
Sesso maschio (ref. femmina)	-0.752 (0.378)	0.47 (0.22-0.99)	0.05
ABCC1 1303C>A CA (ref. CC)	2.275 (0.973)	9.73 (1.45-65.50)	0.02
UGT1A9*22 *22I *22 (ref. *1/ *1)	-1.585 (0.703)	0.20 (0.05-0.81)	0.02
<i>P= 0.001 per il modello di multivariata</i>			
Sesso maschio (ref. femmina)	-0.750 (0.373)	0.47 (0.23-0.98)	0.04
ABCC1 1303C>A CA (ref. CC)	1.899 (0.897)	6.68 (1.15-38.70)	0.03
UGT1A aplotipo I [^] 1 oppure [^] 2 (ref. [^] 0)	-0.922 (0.376)	0.40 (0.19-0.83)	0.01
<i>P= 0.003 per il modello di multivariata</i>			
(C) SEVERA NEUTROPENIA durante il 1 ciclo di terapia			
UGT1A7*3 [^] 2 (ref. [^] 0 oppure [^] 1)	1.699 (0.667)	5.47 (1.48-20.22)	0.01
ABCC2 aplotipo II [^] 2 (ref. [^] 0 or [^] 1)	2.140 (0.929)	8.50 (1.37-52.51)	0.02
ABCG2 aplotipo I [^] 2 (ref. [^] 0 or [^] 1)	1.835 (0.779)	6.27 (1.36-28.85)	0.02
<i>P= 0.004 per il modello di multivariata</i>			
(D) SEVERA NEUTROPENIA durante l'intero corso del trattamento			
ABCC1 1303C>A CA (ref. CC)	1.897 (0.853)	6.66 (1.25-35.48)	0.03
UGT1A aplotipo I [^] 1 oppure [^] 2 (ref. [^] 0)	-0.755 (0.377)	0.47 (0.22-0.98)	0.04
<i>P= 0.01 per il modello di multivariata</i>			

[^] numero di alleli portati dal paziente

4.5.2 TOSSICITÀ NON EMATOLOGICA E DIARREA

In Tabella 4.11 e 4.12 sono riportate le varianti polimorfiche ed aplotipiche che sono state identificate dall'analisi univariata (cut off $p < 0.1$) come possibili fattori genetici implicati nel modulare lo sviluppo rispettivamente di tossicità non ematologica e diarrea. Per quanto riguarda la diarrea, i risultati ottenuti per il primo ciclo di terapia sono da considerarsi di carattere esclusivamente esplorativo a causa dell'esiguo numero ($n=6$) di eventi di grado G3 e G4 osservati nella nostra popolazione di indagine.

Selezionati i markers genici si è effettuata, quindi, l'analisi multivariata che ha permesso di sviluppare alcuni modelli predittivi riassunti in Tabella 4.13.

Per quanto riguarda la tossicità non ematologica durante il primo ciclo di terapia (Tabella 4.13-A) è stato individuato un solo determinante genico significativo, il polimorfismo del trasportatore ABCG2 -15994G>A: i pazienti con genotipo -15994AA, rispetto i pazienti wild-type, mostrano un rischio di 20.28 volte maggiore di andare incontro a reazioni avverse non ematologiche di grado severo (95%CI: 3.76-109.38, $p=0.0005$). L'intervallo di confidenza è particolarmente ampio a causa della bassa prevalenza del polimorfismo nel nostro campione di studio. Il modello predittivo del rischio di presentare effetti tossici non ematologici durante l'intero corso della terapia, comprende, invece, tre fattori significativi (Tabella 4.13-B): il sesso, con un ruolo protettivo per il sesso maschile (OR=0.46 95%CI: 0.23-0.94, $p=0.03$) come già osservato per la tossicità ematologica, e due varianti geniche di due trasportatori, ABCC1 1684C>T, con un maggior rischio presentato dai pazienti portatori di almeno un allele variante 1684T (OR=2.36 95%CI: 1.16-4.79, $p=0.02$), e ABCC2 -1023G>A con, al contrario, la presenza dell'allele variante -1023A associata ad una minore probabilità di manifestazioni avverse (OR=0.24 95%CI: 0.08-0.73, $p=0.01$).

Per quanto riguarda la predisposizione a sviluppare diarrea severa durante il primo ciclo di terapia (Tabella 4.14-C), in maniera concorde alla tossicità non ematologica, è stato individuato come marker predittivo il polimorfismo ABCG2 -15994G>A con un maggior rischio per i pazienti con genotipo -15994AA, rispetto i pazienti wild-type (OR=103.76 95%CI: 9.11-1181.29, $p=0.0002$). A causa dei pochi eventi di diarrea G3-G4 e della bassa prevalenza della variante genica nella popolazione d'indagine, i valore di OR e del relativo intervallo di confidenza sono da considerarsi con cautela, pur rimanendo la forte significatività predittiva attribuita a tale marker genico. Il modello di regressione logistica che descrive il rischio di diarrea severa durante l'intero corso della terapia comprende due elementi (Tabella 4.13-D): di nuovo il polimorfismo ABCG2 -15994G>A, sempre correlato ad

un incremento di probabilità di sviluppare effetti tossici per gli individui con genotipo -15994AA, rispetto ai pazienti wild-type (OR=9.08 95%CI: 1.84-44.84, p=0.007), a cui si aggiunge la variante del gene ABCC1 IVS18 -30G>C, con un maggiore rischio di diarrea di grado G3-G4 per i pazienti portatori di almeno un allele variante IVS18 -30C (OR=2.67 95%CI:1.06-6.73, p=0.04).

Tabella 4.11: Polimorfismi e severa tossicità non ematologica (G3-G4) durante il primo ciclo di terapia (A) e l'intero corso del trattamento (B). Markers selezionati dall'analisi univariata (cut-off p<0.1).

A) TOSSICITA' NON EMATOLOGICA – primo ciclo di terapia

SNP	G3-G4/ Totale				
	N°	%	‡OR	(95% CI)	P
ABCG2 -15994G>A					
GG	5/174	2.9	§1		
GA	3/68	4.4	1.56	0.36-6.72	0.69
AA	3/8	37.5	20.28	3.76-109.42	0.003
ABCG2 CACTdel					
+/+	0/41	0.0	§1		
+/-	5/131	3.8	3.61	0.20-66.71	0.34
-/-	6/78	7.7	7.44	0.41-135.56	0.09

‡ calcolato con Fisher exact test

§ reference category

^ numero di alleli portati dal paziente

B) TOSSICITA' NON EMATOLOGICA – intero trattamento

SNP	G3-G4/ Totale				
	N°	%	‡OR	(95% CI)	P
ABCB1 IVS14+38A>G					
AA	17/73	23.3	§1		
GA	15/122	12.3	0.46	0.21-0.99	0.07
GG	11/55	20.0	0.82	0.35-1.94	0.83
ABCC1 IVS18-30G>C					
GG	24/171	14.0	§1		
GC	17/67	25.4	2.08	1.04-4.19	0.05
CC	2/12	16.7	1.23	0.25-5.94	0.68
GC+CC	19/79	24.1	1.94	0.99-3.80	0.07
ABCC1 1684C>T					
CC	22/165	13.3	§1		
CT	18/72	25.0	2.17	1.08-4.35	0.04
TT	3/13	23.1	1.95	0.50-7.65	0.40
CT+TT	21/85	24.7	2.13	1.10-4.16	0.03
ABCC2 -1023G>A					
GG	39/192	20.3	§1		
GA	3/55	5.5	0.23	0.07-0.76	0.008
AA	1/3	33.3	1.96	0.17-22.21	0.50
GA+AA	4/58	6.9	0.29	0.10-0.85	0.02
ABCC2 -15994G>A					
GG	10/81	12.3	§1		
GA	28/123	22.8	2.09	0.95-4.59	0.07
AA	5/46	10.9	0.87	0.28-2.71	1.00

Tabella 4.12 Polimorfismi e severa diarrea (G3-G4) durante il primo ciclo di terapia **(A)** e l'intero corso del trattamento **(B)**. Markers selezionati dall'analisi univariata (cut-off p<0.1).

A) DIARREA - primo ciclo di terapia

SNP	G3-G4/ Totale				
	N°	%	[‡] OR	(95% CI)	P
ABCC1 -260G>C					
GG	2/164	1.2	[§] 1		
GC	4/74	5.4	4.63	0.83-25.87	0.08
CC	0/12	0.0	2.60	0.12-57.21	1.00
ABCC1 IVS30+18G>A					
GG	2/171	1.2	[§] 1		
GA	4/74	5.4	4.83	0.86-26.98	0.07
AA	0/5	0.0	6.16	0.26-144.36	1.00
GA+AA	4/79	5.1	4.51	0.81-25.15	0.08
ABCG2 -15994G>A					
GG	1/174	0.6	[§] 1		
GA	2/68	2.9	5.24	0.47-58.82	0.19
AA	3/8	37.5	103.80	9.12-1181.60	0.0002
ABCG2 CACTdel					
+/+	0/41	0.0	[§] 1		
+/-	2/131	1.5	1.60	0.08-34.08	1.00
-/-	4/78	5.1	5.01	0.26-95.50	0.30
(+/-, +/+) [§] vs -/-	2/172	1.2	4.60	0.82-25.65	0.08
^ABCG2 aplotipo I					
0	2/179	1.1	[§] 1		
1	3/65	4.6	4.28	0.70-26.24	0.12
2	1/6	16.7	17.70	1.37-229.05	0.09
0+1 [§] vs 2	4/71	5.6	5.25	0.95-29.53	0.06

[‡] calcolato con Fisher exact test

[§] reference category

[^] numero di alleli portati dal paziente

B) DIARREA – intero trattamento

SNP	G3-G4/ Totale				
	N°	%	[‡] OR	(95% CI)	P
UGT1A1*60 [3279T>G]					
TT	3/73	4.1	[§] 1		
TG	17/132	12.9	3.45	0.98-12.20	0.05
GG	1/45	2.2	0.53	0.05-5.26	1.00
ABCC1 -260G>C					
GG	10/164	6.1	[§] 1		
GC	10/74	13.5	2.41	0.96-6.06	0.08
CC	1/12	8.3	1.40	0.16-11.96	0.55
GC+CC	11/86	12.8	2.26	0.92-5.56	0.09
ABCC1 IVS18- 30G>C					
GG	10/171	5.8	[§] 1		
GC	10/67	14.9	2.83	1.12-7.14	0.04
CC	1/12	8.3	1.46	0.17-12.50	0.54
GC+CC	11/79	13.9	2.60	1.06-6.42	0.05
ABCC1 1684C>T					
CC	10/165	6.1	[§] 1		
CT	9/72	12.5	2.21	0.86-5.71	0.12
TT	2/13	15.4	2.82	0.55-14.49	0.21
CT+TT	11/85	12.9	2.30	0.94-5.67	0.09
ABCG2 -15994G>A					
GG	11/174	6.3	[§] 1		
GA	7/68	10.3	1.70	0.63-4.59	0.29
AA	3/8	37.5	8.89	1.88-42.16	0.02

Tabella 4.13. Analisi multivariata effettuata per valutare l'associazione fra le varianti geniche/aplotipiche e il rischio di sviluppare tossicità severa (G3-G4) non ematologica e diarrea Nel modello di regressione logistica sono state inclusi i markers genici e le caratteristiche clinico-demografiche (età, sesso) selezionate dall'analisi univariata ($P < 0.1$)

Markers genici	Estimate (SE)	OR (95% CI)	p-value
(A) SEVERA TOSSICITA' NON EMATOLOGICA durante il 1 ciclo di terapia			
ABCG2 -15994G>A AA (ref. GG)	3.010 (0.860)	20.28 (3.76-109.38)	0.0005
<i>P= 0.002 per il modello di multivariata</i>			
(B) SEVERA TOSSICITA' NON EMATOLOGICA durante l'intero corso del trattamento			
Sesso maschio (ref. femmina)	-0.771 (0.363)	0.46 (0.23-0.94)	0.03
ABCC1 1684C>T CT or TT (ref. CC)	0.858 (0.361)	2.36 (1.16-4.79)	0.02
ABCC1 -1023G>A GA or AA (ref. GG)	-1.430 (0.572)	0.24 (0.08-0.73)	0.01
<i>P= 0.0003 per il modello di multivariata</i>			
(C) SEVERA DIARREA durante il 1 ciclo di terapia			
ABCG2 -15994G>A AA (ref. GG)	4.642 (1.241)	103.76 (9.11-1181.29)	0.0002
<i>P= 0.000075 per il modello di multivariata</i>			
(D) SEVERA DIARREA durante l'intero corso del trattamento			
ABCC1 IVS18 -30G>C CG+CC (ref. GG)	0.981 (0.472)	2.67 (1.06-6.73)	0.04
ABCG2 -15994G>A AA (ref. GG)	2.206 (0.815)	9.08 (1.84-44.84)	0.007
<i>P= 0.005 per il modello di multivariata</i>			

^ numero di alleli portati dal paziente

4.6 VALUTAZIONE CLINICA DELLA RISPOSTA AL TRATTAMENTO

Alla fine dello studio, 238 pazienti hanno completato almeno 4 cicli di terapia e sono stati, quindi, ritenuti valutabili per la risposta. Una risposta obiettiva (risposta completa, CR + risposta parziale, PR) è stata osservata in 103 su 238 pazienti (43.3%) ed è costituita da 18 CR (7.6%) e 85 PR (35.7%). La stabilità della malattia (stable disease, SD) è stata rilevata in 66 dei 238 pazienti (27.7%) mentre 69 (29.0%) di questi hanno sviluppato una progressione tumorale (progression disease, PD), (Tabella 4.14).

Tabella 4.14: Risposta tumorale al trattamento nella popolazione d'indagine (N=238)

Risposta Completa (CR)		Risposta Parziale (PR)		Malattia Stabile (SD)		Malattia in Progressione (PD)	
Totale	%	Totale	%	Totale	%	Totale	%
18	7.6	85	35.7	66	27.7	69	29.0

4.7 POLIMORFISMI GENICI E RISPOSTA TUMORALE

Il ruolo delle varianti geniche ed aplo-tipiche nel modulare la risposta al trattamento è stato valutato in termini di Clinical Benefit (CB, CR + PR + SD) e Response Rate (RR, CR + PR). La valutazione statistica della correlazione genotipo/aplotipo-fenotipo clinico è stata condotta effettuando dapprima un'analisi univariata, in modo da individuare i possibili determinanti di risposta da inserire nella successiva analisi multivariata, e proseguendo, quindi, con la creazione di significativi modelli predittivi.

I markers genici selezionati tramite Test Esatto di Fisher ($p < 0.1$) sono riassunti in Tabella 4.15 e 4.16 rispettivamente per il CB e il RR.

Il modello predittivo del CB (Tabella 4.17-A) comprende un solo determinante genico, l'UGT1A1*28: i pazienti che presentano il genotipo omozigote polimorfico *28/*28 presentano una maggior probabilità di raggiungere un beneficio clinico dalla terapia rispetto i pazienti con genotipo wild-type *1/*1 (OR=4.68 95%CI: 1.03-21.22, $p=0.04$).

Per quanto riguarda il RR si sono individuati due modelli predittivi (Tabella 4.17-B), uno comprendente le singole varianti geniche ed un altro in cui quest'ultime sono state sostituite dal rispettivo aplotipo ove questo fosse risultato significativo dall'analisi univariata.

Il primo modello è costituito da sette fattori predittivi ovvero il numero di siti metastatici e 6 polimorfismi, uno del gene UGT1A1 e 5 di geni codificanti per trasportatori di membrana. In particolare, in maniera analoga al CB, la variante genetica UGT1A1*28 è risultata essere associata alla risposta tumorale con un aumentata probabilità di successo per gli individui con

genotipo *28/*28 rispetto a quelli con genotipo wild-type *1/*1 (OR=3.43 95%CI:1.20-9.83, p=0.02). Per quanto riguarda i polimorfismi di trasportatori di membrana, due varianti del gene ABCG2 sono state evidenziate come marcatori predittivi di risposta al trattamento con un effetto, però, tra loro divergente: per -15622C>T i pazienti che presentano almeno un allele variante -15622T mostrano una minor probabilità di successo della terapia (OR=0.52 95%CI: 0.29-0.94, p=0.03) mentre per la variante -15994G>A i soggetti con almeno un allele variante -15994A presentano un maggior grado di risposta tumorale (OR=1.97 95%CI: 1.05-3.69, p=0.03). In aggiunta a queste, altre tre varianti polimorfiche completano il modello: ABCC1 2012G>T, con i pazienti con genotipo 2012GT che presentano una probabilità 2.64 volte maggiore di risposta obiettiva rispetto ai pazienti con genotipo 2012GG (95%CI: 1.09-6.39, p=0.03), ABCC2 1249G>A, con una inferiore probabilità di efficacia antitumorale del trattamento per gli individui che mostrano almeno un allele variante 1249A (OR=0.45 95%CI: 0.25-0.81, p=0.007) ed, infine, la variante SLCO1B1-11187G>A, correlata con un maggior grado di risposta per i soggetti con genotipo -11187GA rispetto quelli wild-type (OR=2.10 95%CI: 0.99-4.48 p=0.05). Nel predire la risposta al trattamento è stato evidenziato un ruolo importante anche per il numero di siti metastatici: i pazienti con almeno due siti presentano una maggior probabilità di risposta.

Il modello predittivo comprendente le varianti aplotipiche, oltre a presentare sempre il numero di siti metastatici, riconferma la significatività, come determinanti genici di risposta tumorale, del polimorfismo ABCC1 2012G>T (OR=2.49 95%CI: 1.04-5.97, p=0.04) e SLCO1B1-11187G>A, (OR=2.38 95%CI: 1.12-5.03, p=0.02), entrambi con un effetto positivo sull'efficacia della terapia. A questi markers si aggiungono tre aplotipi, ABCC2 aplotipo II, ABCG2 aplotipo III e UGT1A aplotipo II, che vanno a sostituire le singole varianti dei rispettivi geni. I soggetti che presentano almeno un allele dell'aplotipo II di ABCC2 hanno un minor grado di risposta tumorale (OR=0.48 95%CI: 0.27-0.87, p=0.02), mentre quelli che mostrano almeno un allele dell'aplotipo III di ABCG2 hanno 2.37 volte una maggior probabilità di raggiungere una risposta obiettiva (95%CI: 1.27-4.42, p=0.007). Infine, i soggetti portatori di due alleli dell'aplotipo II di UGT1A, rispetto ai pazienti wild-type, mostrano una probabilità 9.90 volte maggiore di rispondere positivamente alla terapia (95%CI: 2.01-48.67, p=0.005).

Bisogna sottolineare che, in entrambi i modelli, come variabile di buona significatività predittiva, rientra anche l'aplotipo SLCO1B1*15 con un impatto positivo sull'efficacia della terapia: i quattro pazienti che presentano due copie di SLCO1B1*15 mostrano tutti una risposta obiettiva al trattamento. A causa però della bassa prevalenza di tale variante

aplotipica nella popolazione d'indagine non è stato possibile calcolare matematicamente gli indici (OR, 95%CI e p-value) all'interno dei modelli sviluppati.

Tabella 4.15: Polimorfismi e Clinical benefit. Markers selezionati dall'analisi univariata (cut-off p<0.1).

CLINICAL BENEFIT					
SNP	Yes/ Overall				
	N°	%	‡OR	(95% CI)	P
UGT1A1*28					
*1/ *1	73/109	67.0	§1		
*1/ *28	77/108	71.3	1.22	0.69-2.18	0.56
*28/ *28	19/21	90.5	4.68	1.03-21.23	0.04
ABCB1 2677G>A/T					
GG	53/83	63.9	§1		
GT+GA	86/118	72.9	1.52	0.83-2.78	0.21
TT+TA	30/37	81.1	2.43	0.95-6.19	0.09
ABCB1 IVS13+24C>T					
CC	43/69	62.3	§1		
CT	89/120	74.2	1.74	0.92-3.28	0.10
TT	37/49	75.5	1.86	0.83-4.20	0.16
CT+TT	126/169	74.6	1.77	0.97-3.22	0.08
ABCC1 IVS18-30G>C					
GG	121/162	74.7	§1		
GC	43/65	66.2	0.66	0.35-1.24	0.20
CC	5/11	45.5	0.28	0.08-0.97	0.07
ABCC1 1684C>T					
CC	118/156	75.6	§1		
CT	45/70	64.3	0.58	0.31-1.07	0.11
TT	6/12	50.0	0.32	0.10-1.06	0.08
CT+TT	51/82	62.2	0.53	0.30-0.94	0.04
ABCC1 4002G>A					
GG	94/124	75.8	§1		
GA	64/100	64.0	0.57	0.32-1.01	0.06
AA	11/14	78.6	1.17	0.31-4.48	1.00
ABCC2 1249G>A					
GG	96/137	70.1	§1		
GA	61/89	68.5	0.93	0.52-1.66	0.88
AA	12/12	100.0	10.75	0.62-186.00	0.04
^ABCC2 aplotipo II					
0	99/141	70.2	§1		
1	61/88	69.3	0.96	0.54-7.71	0.88
2	9/9	100.0	8.12	0.46-142.72	0.06

‡ calcolato con Fisher exact test

§ reference category

^ numero di alleli portati dal paziente

Tabella 4.16: Polimorfismi e Response Rate. Markers selezionati dall'analisi univariata (cut-off $p < 0.1$).

RESPONSE RATE

SNP	Yes/ Overall			
	N°	%	‡OR (95% CI)	P
UGT1A1*28	44/109	40.4		
*1/ *1	45/108	41.7	§1	
*1/ *28	14/21	66.7	1.05 0.61-1.81	0.89
*28/ *28	48/123	39.0	2.95 1.10-7.91	0.03
UGT1A1*93 [3156G>A]	43/99	43.4		
GG	12/16	75.0	§1	
GA	44/109	40.4	1.20 0.70-2.05	0.58
AA	45/108	41.7	4.69 1.43-15.38	0.008
UGT1A aplotipo II				
0	55/141	39.0	§1	
1	38/85	44.7	1.26 0.73-2.18	0.41
2	10/12	83.3	7.82 1.65-37.05	0.004
ABCC1 2012G>T				
GG	86/211	40.8	§1	
GT	17/27	63.0	2.47 1.08-5.66	0.04
ABCC2 1249G>A				
GG	69/137	50.4	§1	
GA	26/89	29.2	0.41 0.23-0.72	0.002
AA	8/12	66.7	1.97 0.57-6.86	0.37
GA+AA	34/101	33.7	0.50 0.29-0.85	0.01
ABCC2 3972C>T				
CC	42/106	39.6	§1	
CT	46/107	43.0	1.15 0.67-1.98	0.68
TT	15/25	60.0	2.29 0.94-5.57	0.08
ABCC2 aplotipo II				
0	70/141	49.6	§1	
1	28/88	31.8	0.47 0.27-0.83	0.01
2	5/9	55.6	1.27 0.33-4.92	1.00
1+2	33/97	34.0	0.52 0.31-0.89	0.02
ABCC2 IVS23 +56C>T				
CC	40/101	39.6	§1	
CT	46/111	41.4	1.08 0.62-1.87	0.89
TT	17/26	65.4	2.88 1.17-7.09	0.03

‡ calcolato con Fisher exact test

§ reference category

^ numero di alleli portati dal paziente

SNP	Yes/ Overall			
	N°	%	‡OR (95% CI)	P
ABCG2 -15622C>T				
CC	64/125	51.2	§1	
CT	32/92	34.8	0.51 0.29-0.88	0.02
TT	7/21	33.3	0.48 0.18-1.26	0.16
CT+TT	39/113	34.5	0.50 0.30-0.85	0.01
ABCG2 1143C>T				
CC	69/143	48.3	§1	
CT	29/83	34.9	0.58 0.33-1.01	0.07
TT	5/12	41.7	0.77 0.23-2.53	0.77
CT+TT	34/95	35.8	0.60 0.35-1.02	0.06
ABCG2 -15994G>A				
GG	63/166	38.0	§1	
GA	38/65	58.5	2.30 1.28-4.13	0.01
AA	2/7	28.6	0.65 0.12-3.47	0.71
GA + AA	40/72	55.6	2.04 1.17-3.58	0.02
ABCG2 aplotipo III				
0	65/171	38.0	§1	
1	36/62	58.1	2.26 1.25-4.08	0.01
2	2/5	40.0	1.09 0.18-6.68	1.00
1+2	38/67	56.7	2.14 1.20-3.79	0.01
ABCG2 aplotipo II				
0	75/156		§1	
1	25/73		0.56 0.32-1.00	0.06
2	3/9		0.54 0.13-2.24	0.50
1+2	28/82		0.56 0.32-0.97	0.05
SLCO1B1 521T>C				
TT	71/177	40.1	§1	
TC	26/53	49.1	1.44 0.78-2.66	0.27
CC	6/8	75.0	4.48 0.88-22.83	0.07
SLCO1B1 *15				
0	75/185	40.5	§1	
1	24/49	49.0	1.41 0.75-2.65	0.33
2	4/4	100.0	13.17 0.70-248.44	0.03
SLCO1B1 -1187G>A				
GG	80/198	40.4	§1	
GA	23/40	57.5	2.00 1.00-3.97	0.05

Tabella 4.17: Analisi multivariata effettuata per valutare l'associazione fra le varianti geniche/aplotipiche e il Clinical Benefit (CB) e Response Rate (RR). Nel modello di regressione logistica sono state inclusi i markers genici e le caratteristiche clinico-demografiche (sesso, età, sito del tumore primario [colon destro/sinistro, retto], stadio tumorale TNM, chemio/radioterapia adiuvante sì/no, chirurgia radicale sì/no, numeri di siti metastatici) selezionate dall'analisi univariata ($P < 0.1$).

Markers genici	Estimate (SE)	OR (95% CI)	p-value
(A) CLINICAL BENEFIT			
UGT1A1*28 *28/ *28 (ref. *1/ *1)	1.544 (0.771)	4.68 (1.03-21.22)	0.04
<i>P= 0.02 per il modello di multivariata</i>			
(B) REPOSE RATE			
Numero di siti metastatici ≥ 2 (ref. 1)	0.862 (0.299)	2.37 (1.32-4.25)	0.004
ABCC1 2012G>T GT (ref. GG)	0.969 (0.452)	2.64 (1.09-6.39)	0.03
ABCC2 1249G>A GA + AA (ref. GG)	-0.801 (0.299)	0.45 (0.25-0.81)	0.007
ABCG2 -15622C>T CT + TT (ref. CC)	-0.647 (0.301)	0.52 (0.29-0.94)	0.03
ABCG2 -15994G>A GA + AA (ref. GG)	0.678 (0.321)	1.97 (1.05-3.69)	0.03
SLCO1B1 -11187G>A GA (ref. GG)	0.744 (0.385)	2.10 (0.99-4.48)	0.05
UGT1A1*28 *28/ *28 (ref. *1/ *1)	1.234 (0.537)	3.43 (1.20-9.83)	0.02
<i>P= 0.000001 per il modello di multivariata</i>			
Numero di siti metastatici ≥ 2 (ref. 1)	0.748 (0.295)	2.11 (1.19-3.77)	0.01
ABCC1 2012G>T GT (ref. GG)	0.914 (0.445)	2.49 (1.04-5.97)	0.04
SLCO1B1 -11187G>A GA (ref. GG)	0.866 (0.382)	2.38 (1.12-5.03)	0.02
ABCC2 aplotipo II $\hat{2}$ or $\hat{1}$ (ref. $\hat{0}$)	-0.725 (0.300)	0.48 (0.27-0.87)	0.02
ABCG2 aplotipo III $\hat{2}$ or $\hat{1}$ (ref. $\hat{0}$)	0.863 (0.318)	2.37 (1.27-4.42)	0.007
UGT1A aplotipo II $\hat{2}$ (ref. $\hat{0}$)	2.292 (0.813)	9.90 (2.01-48.67)	0.005
<i>P= 0.00000095 per il modello di multivariata</i>			

[^] numero di alleli portati dal paziente

4.8 POLIMORFISMI GENICI, TEMPO ALLA PROGRESSIONE TUMORALE E SOPRAVVIVENZA.

In questa parte del lavoro è stato valutato, seguendo le procedure statistiche riportate nella sezione “Materiali e Metodi” di questa tesi, il ruolo delle varie varianti genetiche ed aplo-tipiche nell’influenzare il tempo alla progressione tumorale (Time to Progression, TTP) e la sopravvivenza (Overall Survival, OS) del paziente.

Per quanto riguarda il TTP lo studio è stato condotto su 232 dei 250 pazienti, in quanto 12 non erano valutabili per risposta e 6 non sono stati seguiti in maniera adeguata al follow-up in modo da valutare il momento della progressione di malattia. Dei 232 pazienti inclusi nell’analisi, al termine dello studio, 206 (88.8%) sono risultati in progressione e 26 (11.2%) non in progressione di malattia; la mediana del tempo alla progressione, calcolata considerando i pazienti con recidiva, è di 7.4 mesi. (range 0.7-41.6).

Per tutti i 250 pazienti è stato, invece, possibile ottenere l’informazione riguardo la sopravvivenza e sono stati, quindi, inseriti nello studio; alla chiusura del trial clinico, 130 (52.0%) pazienti erano deceduti mentre 120 (48.0%) erano ancora vivi. La mediana di sopravvivenza, calcolata considerando i pazienti deceduti, è di 15.4 mesi (range 0.8-63.5).

4.8.1 POLIMORFISMI GENICI E TEMPO ALLA PROGRESSIONE TUMORALE

Per ciascun genotipo ed aplotipo, relativo ai vari polimorfismi considerati, è stata ricavata, secondo la rappresentazione di Kaplan-Meier, la curva raffigurante il tempo alla progressione tumorale ed è stato calcolato il tempo alla progressione mediano. Le varie curve ottenute sono state poi confrontate per mezzo del test statistico di log-rank mentre la determinazione del rischio relativo di progressione per ciascun status genotipico/aplotipico è stata realizzata tramite il “Cox proportional hazards regression model”. La procedura statistica ha previsto un’analisi univariata preliminare ed una successiva analisi multivariata che ha permesso la costruzione di alcuni modelli significativi predittivi il tempo alla progressione tumorale; in questa seconda fase si sono incluse le varianti genetiche/aplotipiche e le caratteristiche clinico-demografiche dei pazienti (sesso, età, sito del tumore primario [colon destro/sinistro, retto], stadio tumorale TNM, chemio/radioterapia adiuvante sì/no, chirurgia radicale sì/no, numeri di siti metastatici) selezionate tramite l’analisi univariata (cut-off $p < 0.05$). I risultati ottenuti nello studio preliminare sono riportati in Tabella 4.18 dove sono riassunti i markers genetici per i quali è stato individuato un grado di significatività inferiore a 0.1.

Tabella 4.18: Polimorfismi e Time To progression (TTP). Markers genetici evidenziati dall'analisi univariata; in tabella sono riportate le associazioni con $p < 0.1$.

MARKERS	N° Totale	Eventi N (%)	TTP Mediano (mesi)	Log-rank Test (p-value)	HR	95%CI	P-value
UGT1A1*28							
*1 /*1	107	97 (90.7)	7.4		§1		
*1 /*28	105	91 (86.7)	7.93	0.02	0.73	0.54-0.97	0.03
*28 /*28	20	18 (90.0)	10.5		0.56	0.33-0.94	0.03
^UGT1A aplotipo II							
0	139	129 (92.8)	7.4		§1		
1 + 2	93	77 (82.8)	9.03	0.01	0.69	0.52-0.92	0.01
^UGT1A aplotipo III							
0 + 1	228	202 (88.6)	8.00		§1		
2	4	4 (100.0)	4.33	0.06	2.52	0.93-6.81	0.07
ABCC1 IVS18 -30G>C							
GG	156	134 (85.9)	8.93		§1		
GC+CC	76	72 (94.7)	7.17	0.05	1.33	1.00-1.77	0.05
ABCG2 1143C>T							
CC	140	120 (85.7)	8.43		§1		
CT+TT	92	86 (93.5)	7.20	0.07	1.30	0.98-1.71	0.07
ABCG2 aplotipo II							
0	152	131 (86.2)	8.43		§1		
1+2	80	75 (93.8)	7.20	0.08	1.29	0.97-1.72	0.08
SLCO1B1 -11187G>A							
GG	193	173 (89.6)	7.47		§1		
GA	39	33 (84.6)	9.87	0.06	0.7	0.48-1.02	0.06
SLCO1B1 388A>G							
AA	78	73 (93.6)	7.43		§1		
AG +GG	154	133 (86.4)	8.57	0.08	0.78	0.58-1.03	0.08

§ reference category

^ numero di alleli portati dal paziente

L'analisi multivariata (Tabella 4.19-A,B) ha evidenziato due marker genici significativi nel descrivere il tempo alla progressione tumorale, il polimorfismo UGT1A1*28 ed, in aggiunta a questo, l'aplotipo che lo contiene (UGT1A aplotipo II). In particolare, i pazienti con genotipo UGT1A1*28/*28 hanno un rischio di progressione della malattia significativamente inferiore rispetto ai pazienti con genotipo wild-type *1/*1 (HR=0.56 95%CI: 0.33-0.96, p=0.03); gli individui con genotipo *28/*28 e *1/*1 presentano un tempo alla progressione mediano rispettivamente di 10.5 e 7.4 mesi. In maniera analoga gli individui che possiedono almeno un allele dell'aplotipo II di UGT1A, rispetto a quelli che non lo hanno, mostrano un tempo alla progressione tumorale mediano significativamente (p=0.02) più lungo (9.03 vs 7.4 mesi, HR=0.71 95%CI 0.53-0.95). Nei due modelli identificati, assieme ai due marker genici, rientra, come fattore predittivo il tempo alla progressione, anche la localizzazione del tumore primario. In particolare, i pazienti che presentano come sito tumorale primario il colon destro hanno un rischio 1.4 volte maggiore di andare incontro a progressione di malattia rispetto a quelli con localizzazione al colon sinistro. In Figura 4.5 è riportata la rappresentazione grafica delle curve rappresentanti il tempo alla progressione tumorale relativamente ai determinanti genetici e clinici evidenziati come significativi dall'analisi multivariata.

Tabella 4.19: Analisi multivariata tramite "Cox proportional hazards regression model" effettuata per valutare l'associazione fra le varianti geniche/ aplotipiche e il Tempo alla progressione (TTP). Nello studio sono stati inclusi i markers genici e le caratteristiche clinico-demografiche selezionate dall'analisi univariata (P<0.05). Due sono i modelli predittivi ottenuti.

(A)

MARKERS	HR	95%CI	P-value
UGT1A1*28			
*1 / *1	§1		
*1 / *28	0.76	0.56-1.02	0.06
*28 / *28	0.56	0.33-0.96	0.03
Localizzazione del tumore primario			
Colon sinistro	§1		
Retto	1.31	0.94-1.85	0.12
Colon destro	1.40	1.00-1.96	0.05

** P-value Log-rank test: 0.01

§ reference category

(B)

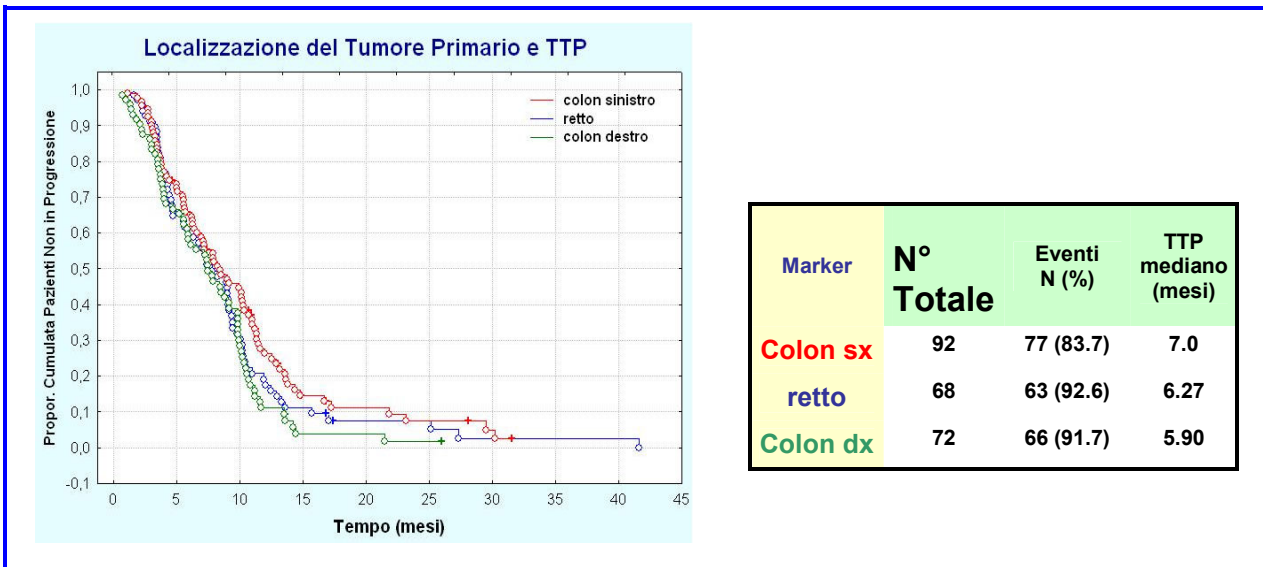
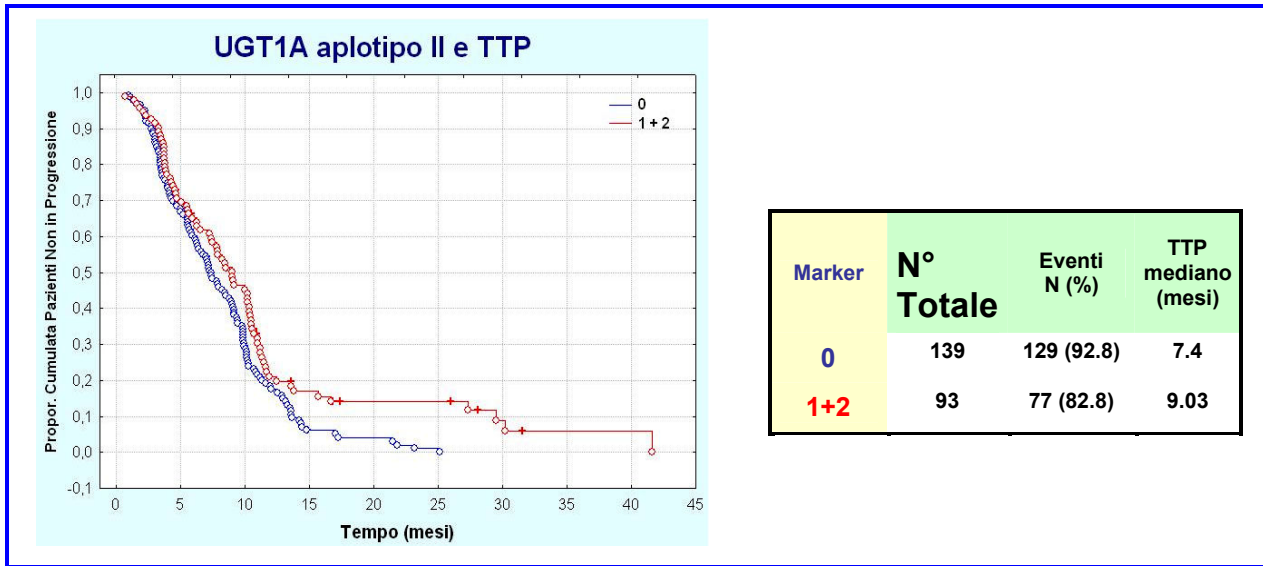
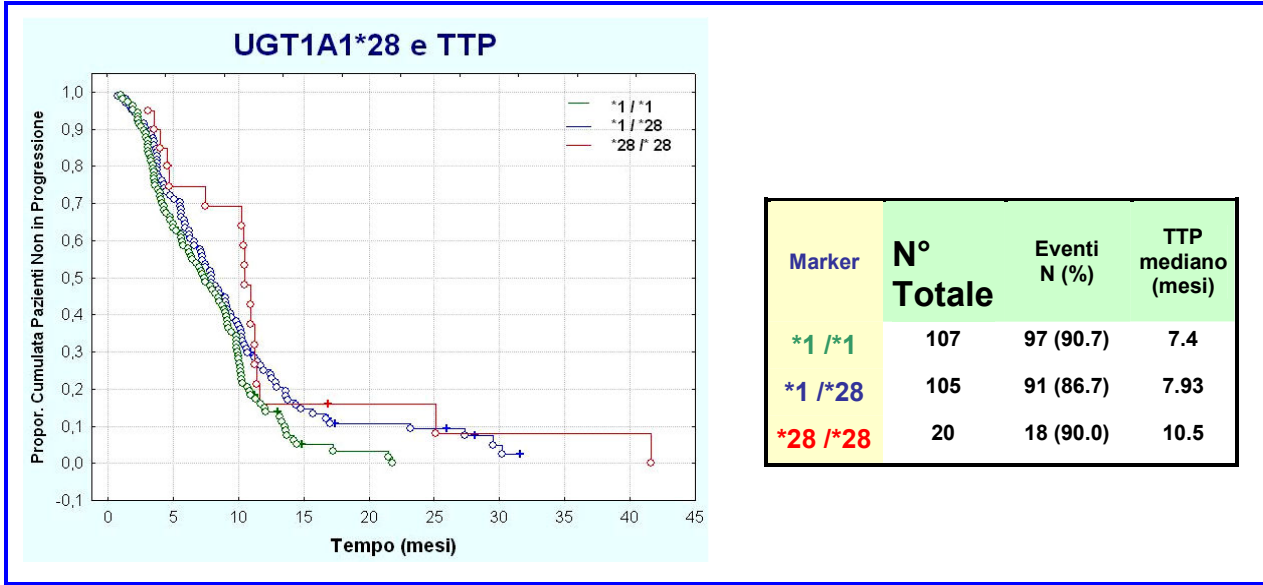
MARKERS	HR	95%CI	P-value
UGT1A aplotipo II			
0	§1		
1 + 2	0.71	0.53-0.95	0.02
Localizzazione del tumore primario			
Colon sinistro	§1		
Retto	1.27	0.90-1.77	0.17
Colon destro	1.43	1.03-2.00	0.03

** P-value Log-rank test: 0.008

§ reference category

^ numero di alleli portati dal paziente

Figura 4.5: Rappresentazione grafica delle curve raffiguranti il tempo alla progressione, secondo la rappresentazione di Kaplan-Meier, e tempo alla progressione mediano per ciascun genotipo/aplotipo.



4.8.2 POLIMORFISMI GENICI E SOPRAVVIVENZA

Analizzando uno per volta tutti i markers genici sotto indagine, per ciascun genotipo/aplotipo è stata ricavata la curva di sopravvivenza secondo il metodo di Kaplan-Meier ed è stato calcolato il Tempo di Sopravvivenza Mediano (MST); tramite il test di log-rank, è stata poi valutata statisticamente la differenza fra le stesse curve ottenute ed, infine, per mezzo del metodo “Cox proportional hazards regression model” è stato determinato il rischio relativo di morte per ciascun status genotipico/aplotipico. In Tabella 4.20 sono schematizzati i risultati ottenuti dall’analisi univariata; sono riportate le associazioni che hanno mostrato un grado di significatività inferiore a 0.1. E’ stata effettuata, quindi, l’analisi multivariata allo scopo di identificare possibili modelli predittivi la sopravvivenza del paziente; nello studio si sono incluse le varianti genetiche/aplotipiche e le caratteristiche clinico-demografiche dei pazienti (sesso, età, sito del tumore primario [colon destro/sinistro, retto], stadio tumorale TNM, chemio/radioterapia adiuvante sì/no, chirurgia radicale sì/no, numeri di siti metastatici) selezionati tramite l’analisi univariata (cut-off $p < 0.05$). Lo studio ha evidenziato come unico marcatore predittivo di sopravvivenza la presenza o meno dell’intervento di chirurgia radicale. I pazienti che sono stati sottoposti a chirurgia radicale mostrano una mediana di sopravvivenza significativamente ($p < 0.0001$) maggiore rispetto a quelli che non hanno subito l’intervento radicale (25.2 vs 14.0 mesi) e presentano, quindi, un rischio inferiore di andare incontro a morte (HR:0.43 95%CI 0.29-0.63). I dati che descrivono il ruolo della chirurgia radicale nell’influenzare la sopravvivenza del paziente sono riassunti in Tabella 4.21 e in Figura 4.6.

Tabella 4.20: Polimorfismi e Sopravvivenza (OS). Markers genetici evidenziati dall'analisi univariata; in tabella sono riportate le associazioni con $p < 0.1$.

MARKERS	N° Totale	Eventi N (%)	MST (mesi)	Log-rank Test (p-value)	HR	95%CI	P-value
ABCB1 2677 G>T/A							
GG	86	55 (64.0)	19.1		§ ₁		
GT/GA	125	57 (45.6)	23.5	0.03	0.65	0.45-0.95	0.02
TT/TA	39	18 (46.2)	25.2		0.58	0.34-0.99	0.05
GT/GA + TT/TA	164	75 (45.7)	23.7	0.01	0.63	0.45-0.9	0.01
ABCB1 3435C>T							
CC	67	41 (61.2)	21.3		§ ₁		
CT + TT	183	89 (48.6)	23.5	0.09	0.72	0.50-1.05	0.09
^ABCB1 aplotipo I							
0	65	30 (46.2)	25.1		§ ₁		
1	131	66 (50.4)	22.2	0.14	1.18	0.77-1.82	0.45
2	54	34 (63.0)	19.1		1.62	0.99-2.65	0.06
^ABCB1 aplotipo II							
0	97	59 (60.8)	19.3		§ ₁		
1 + 2	153	71 (46.4)	24.4	0.03	0.69	0.48-0.97	0.03
ABCB1 IVS4 -25G>T							
GG	153	74 (48.4)	23.5		§ ₁		
GT + TT	97	56 (57.7)	20.4	0.03	1.46	1.03-2.07	0.03
ABCB1 IVS13 +24C>T							
CC	71	44 (62.0)	19.1		§ ₁		
CT + TT	179	86 (48.0)	23.0	0.08	0.72	0.50-1.04	0.08
ABCB1 IVS14 +38A>G							
AA	73	45 (61.6)	19.3		§ ₁		
AG + GG	177	85 (48.0)	23.5	0.08	0.72	0.50-1.04	0.08

§ reference category

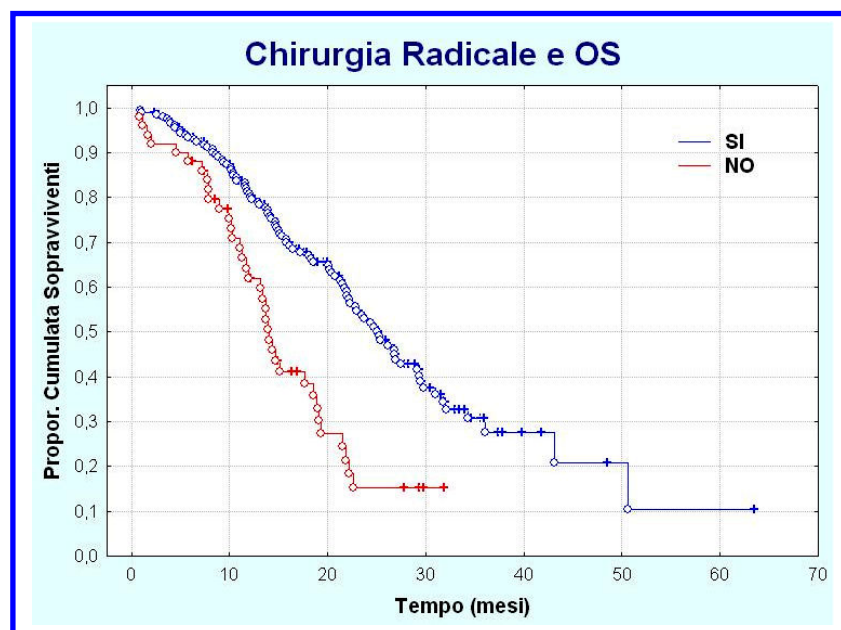
^ numero di alleli portati dal paziente

MST: tempo alla sopravvivenza mediano

Tabella 4.21: Analisi multivariata tramite “Cox proportional hazards regression model” effettuata per valutare l’associazione fra le varianti geniche/ aplotipiche e la Sopravvivenza (OS). Nello studio sono stati inclusi i markers genici e le caratteristiche clinico-demografiche selezionate dall’analisi univariata ($P < 0.05$). Solo l’intervento di chirurgia radicale è risultato significativo.

MARKERS	N° Totale	Eventi N (%)	MST (mesi)	Log-rank Test (p-value)	HR	95%CI	P-value
Chirurgia Radicale							
NO	50	36 (72.0)	14.0	<0.0001	§1		
SI	200	94 (47.0)	25.2		0.43	0.29-0.63	<0.0001

Figura 4.5: Rappresentazione grafica della curva raffigurante la sopravvivenza, secondo la rappresentazione di Kaplan-Meier, in base al fatto che il paziente sia stato sottoposto o meno a chirurgia radicale.



4.9 ANALISI FARMACOCINETICHE

Lo studio di farmacocinetica è stato condotto su 71 dei 250 pazienti inclusi nel lavoro di farmacogenetica di questa tesi; questi pazienti sono stati arruolati al C.R.O. di Aviano e all'ospedale di Noale. Le analisi farmacocinetiche sono state effettuate durante il primo ciclo di trattamento; in particolare campioni di sangue intero eparinizzato sono stati ottenuti prima della somministrazione della terapia e successivamente a 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.25, 2.50, 2.75, 3.0, 3.50, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0, 14.0, 26.0 e 50.0 ore dopo l'inizio dell'infusione con irinotecano. Per determinare i parametri farmacocinetici di CPT-11, SN-38 e SN-38G sono state utilizzate analisi non-compartimentali, secondo le modalità descritte nella sezione "Materiali e Metodi". Sono state valutate la concentrazione plasmatica nel tempo di CPT-11, SN-38 e SN-38G, (area sotto la curva, AUC), l'efficienza della glucuronazione dell'SN-38 a SN-38G nel plasma (glucuronidation ratio, GR, $AUC\ SN-38G / AUC\ SN-38$) e l'indice biliare dell'SN-38 (biliary index, BI, $AUC\ CPT-11X (AUC\ SN-38 / AUC\ SN-38G)$). Le differenze fra questi parametri farmacocinetici rispetto al genotipo/aplotipo sono state analizzate con i test non parametrici di Anova-Kruskal Wallis e U-Mann Whitney.

4.9.1 POLIMORFISMI GENICI E RELAZIONI FARMACOCINETICHE

Lo studio di farmacocinetica è stato effettuato valutando il ruolo delle varianti genetiche ed aplotipiche nel modulare i seguenti parametri: AUC di CPT-11, AUC di SN-38, AUC di SN-38G, BI e GR. I markers genici per cui è stata rilevata un'associazione significativa ($p < 0.05$), relativamente ad almeno uno dei parametri farmacocinetici investigati, sono riportati in Tabella 4.22. Per quanto riguarda la correlazione tra genitivo/aplotipo ed AUC di CPT-11, non è stata evidenziata nessuna associazione statisticamente significativa ($p < 0.05$) e quindi tale parametro non è stato riportato in tabella.

Per i polimorfismi relativi alle isoforme dell'enzima UGT1A, ed in particolare per i markers UGT1A1*28, *93 e *60 e UGT1A7*3, è stato evidenziato un ruolo particolarmente importante nel modulare due parametri, il GR e il BI, mentre nessun effetto è stato rilevato in relazione all' AUC di SN-38. In generale, all'aumentare degli alleli polimorfici di queste varianti genetiche, si osserva una diminuzione significativa del GR e, al contrario, ad un aumento del BI. UGT1A1*28 e *93 hanno dimostrato, inoltre, anche un impatto sull' AUC di SN-38G, il cui valore tende a decrescere all'aumentare del numero di alleli polimorfici. Per le due forme aplotipiche di UGT1A, l'aplotipo I si è dimostrato avere un ruolo nel modulare

l'AUC di SN-38 mentre l'aplotipo II è risultato impattare significativamente l'AUC di SN-38G.

Per il trasportatore di membrana ABCB1 è stata individuata una sola correlazione marginalmente significativa riguardante il ruolo dell'aplotipo I nel modulare l'AUC di SN-38G il cui valore decresce all'aumentare del numero di alleli presentati dal paziente.

Anche per il carrier ABCC1 si sono ottenuti pochi e sparsi dati significativi; in particolare l'effetto più rilevante è quello del polimorfismo ABCC1 2012G>T il quale è risultato essere correlato ad un incremento dell'AUC di SN-38 e, al contrario, ad una diminuzione dell'AUC della forma glucuronata.

Per il gene ABCC2, due polimorfismi, il -1019A>G e il -1549G>A, sono risultati in completo LD nel sottogruppo dei 71 pazienti arruolati per lo studio di farmacocinetica, e si sono dimostrati, inoltre, particolarmente importanti nel modulare l'AUC di SN-38 e il BI, due parametri che aumentano significativamente all'aumentare del numero di alleli polimorfici, e in maniera secondaria il GR che, al contrario, tende a diminuire. Un effetto analogo è stato evidenziato anche per la variante IVS23 +56C>T. Altri markers per cui è stato individuato un ruolo nel modulare aspetti farmacocinetici, sebbene con un impatto meno definito e più marginale, sono i polimorfismi 1249G>A e 3972C>T e i due aplotipi I e II.

Per il trasportatore ABCG2 la correlazione più importante è stata individuata per l'aplotipo I, la cui presenza porta ad un significativo aumento del BI. Altre associazione più o meno tendenziali sono state trovate per i polimorfismi CACTdel, -15622C>T e 1143C>T.

Infine, per il carrier di uptake SLCO1B1, un ruolo significativo è stato evidenziato per 388A>G e 521T>C: l'allele 388G e 521T si sono dimostrati essere associati ad una diminuzione dell'AUC di SN-38 e del BI ed, invece, ad un incremento del GR.

Per i due citocromi, la variante genica CYP3A4*1B è risultata essere correlata ad un significativo aumento del SN-38G e del GR; mentre il polimorfismo CYP3A5*3 è risultato essere marginalmente associato ad una diminuzione del BI.

Tabella 4.22. Associazione tra genotipi/aplotipi e parametri farmacocinetici (N=71); in rosso sono evidenziate le associazioni con con $P \leq 0.05$.

Genotipo/Aplotipo	N°	SN38 AUC ($\mu\text{M}^*\text{h}$)				SN38-G AUC ($\mu\text{M}^*\text{h}$)				GR				BI ($\mu\text{M}^*\text{h}$)			
		mediana	range	[^] P	^{^^} P ^s	mediana	range	[^] P	^{^^} P ^s	mediana	range	[^] P	^{^^} P ^s	mediana	range	[^] P	^{^^} P ^s
UGT1A1*28																	
*1/*1	31	0.86	0.24-3.76	0.7	0.7	3.40	1.99-52.72	0.04	0.01	3.75	1.61-14.01	0.01	0.005	4.40	1.45-15.13	0.007	0.003
*1/*28	32	1.07	0.32-2.26		0.6	3.10	1.46-27.90		0.04	3.32	1.29-15.91		0.01	5.62	1.86-12.76		0.007
*28/*28	8	1.20	0.51-2.73			1.89	0.46-17.41		ref	1.86	0.90-6.37		ref	9.83	3.84-14.73		ref
UGT1A1*93																	
GG	34	1.04	0.24-3.76	0.7	0.8	3.55	1.46-52.72	0.07	0.04	3.60	1.60-14.01	0.7	0.053	5.27	1.45-15.13	0.7	0.04
GA	31	1.04	0.32-2.26		0.9	2.91	1.72-27.90		0.08	3.57	1.08-15.91		0.08	5.88	1.86-14.73		0.058
AA	6	0.95	0.51-2.73			1.74	0.46-17.41			1.98	0.90-6.37		ref	9.05	3.84-12.50		ref
UGT1A1*60																	
TT	18	0.78	0.24-2.72	0.2	0.1	2.79	2.11-7.89	0.5	0.3	4.00	1.60-10.35	0.6	0.048	4.99	1.45-15.13	0.2	0.03
TG	42	1.12	0.32-3.76		0.9	3.32	1.46-52.72		0.2	3.52	1.09-15.91		0.07	4.65	1.86-14.73		0.02
GG	11	1.02	0.51-2.73			2.88	0.46-17.41		ref	2.18	0.90-7.68		ref	8.62	3.84-12.50		
UGT1A7*3																	
0	32	0.96	0.24-3.76	0.9	0.8	3.41	1.89-52.72	0.1	0.1	4.00	1.60-15.91	0.5	0.02	4.15	1.45-15.13	0.058	0.007
1	32	1.04	0.32-2.73		0.8	3.04	1.46-17.41		0.4	3.52	1.09-9.16		0.07	5.77	2.02-14.73		0.02
2	7	0.91	0.51-2.26		ref	2.88	0.46-7.02		ref	1.95	0.90-7.68		ref	9.58	3.84-12.76		ref
UGT1A aplotipo I																	
0	27	1.23	0.35-2.73	0.1	0.046	2.91	0.46-27.90	0.2	0.9	2.80	0.90-15.91	0.4	0.3	6.03	1.86-14.73	0.3	0.2
1	35	1.03	0.24-3.76		0.2	3.41	1.46-52.72		0.2	4.26	1.60-14.01		0.7	4.10	1.45-15.13		0.9
2	9	0.76	0.37-1.48			2.49	2.12-7.64		ref	3.23	2.57-10.10		ref	5.27	1.97-8.28		ref
UGT1A aplotipo II																	
0	44	1.04	0.24-3.76	0.4	0.1	3.55	1.46-52.72	0.005	0.006	3.65	1.60-15.91	0.4	0.07	4.56	1.45-15.13	0.6	0.1
1	24	1.07	0.32-2.73		0.1	2.75	1.49-17.41		0.02	3.07	1.09-9.16		0.1	6.31	2.02-14.73		0.4
2	3	0.53	0.51-0.89		ref	1.58	0.46-1.90		ref	1.78	0.90-3.55		ref	9.26	3.84-12.50		ref
ABCB1 aplotipo I																	
0	19	1.13	0.63-3.76	0.4	0.3	3.89	1.46-52.72	0.042	0.1	3.75	1.60-14.01	0.8	0.7	6.62	2.05-15.13	0.5	0.8
1	33	1.02	0.24-2.26		0.8	3.04	0.46-27.90		0.6	3.57	0.90-15.91		0.3	4.72	1.45-14.73		0.5
2	19	0.88	0.37-2.73		ref	2.59	1.89-17.41		ref	3.07	1.72-7.68		ref	5.68	1.97-12.14		ref

ABCC1 2012G>T																	
GG	64	0.91	0.24-3.76	0.04	0.2	3.01	0.46-52.72	0.005	0.056	3.40	0.90-15.91	0.7	0.8	5.46	1.45-15.13	0.2	0.7
GT	7	1.29	0.85-1.75		ref	4.93	3.31-6.57		ref	3.57	2.57-7.69		ref	3.92	3.29-8.45		ref
ABCC1 4002A>G																	
GG	40	1.04	0.24-2.73	0.3	0.7	3.10	0.46-27.90	0.3	0.2	3.07	0.90-15.91	0.046	0.3	6.15	1.45-12.76	0.3	0.1
GA	29	0.91	0.32-3.76		0.6	3.04	1.46-52.72		0.3	4.08	1.09-14.01		0.7	4.89	1.97-15.13		0.2
AA	2	1.20	1.18-1.23		ref	5.70	4.37-7.02		ref	4.75	3.57-5.94		ref	3.11	2.93-3.29		ref
ABCC2 1249G>A																	
GG	45	1.10	0.32-3.76	0.8	0.9	3.16	1.46-52.72	0.8	0.2	3.33	1.09-15.91	0.1	0.08	5.31	1.86-15.13	0.1	0.08
GA	23	0.86	0.24-2.73		0.5	3.24	0.46-17.41		0.2	4.37	0.90-10.35		0.03	4.10	1.45-12.50		0.03
AA	3	1.02	0.83-1.73		ref	1.93	1.49-4.39		ref	2.31	1.47-2.53		ref	8.85	7.83-9.58		ref
GG+GA	68	1.04	0.24-3.76		0.8				0.2	3.56	0.90-15.91		0.05	5.20	1.45-15.13		0.05
ABCC2 -1019A>G/ -1549G>A**																	
AA/GG	18	0.84	0.24-2.73	0.03	0.007	2.94	0.46-17.41	0.5	0.3	4.55	0.90-10.35	0.2	0.047	3.78	1.45-12.50	0.03	0.01
AG/GA	38	1.04	0.32-3.76		0.01	3.27	1.46-52.72		0.7	3.28	1.60-14.01		0.09	5.29	1.97-9.82		0.02
GG/AA	15	1.73	0.63-2.72		ref	3.04	1.88-27.90		ref	3.03	1.09-15.91		ref	7.65	1.86-15.13		ref
ABCC2 3972C>T																	
CC	26	0.87	0.24-3.76	0.1	0.08	2.94	0.46-52.72	0.2	0.6	3.43	0.90-14.01	0.8	0.09	4.76	1.45-12.50	0.3	0.03
CT	37	1.13	0.32-2.72		0.2	3.41	1.46-27.90		0.6	3.57	1.09-15.91		0.06	5.27	1.86-15.13		0.02
TT	8	1.44	0.63-2.26		ref	2.98	2.43-7.89		ref	2.20	1.29-5.75		ref	8.63	3.81-12.76		ref
CC+CT	63	0.91	0.24-3.76		0.1	3.20	0.46-52.72		0.9	3.55	0.90-15.91		0.056	5.14	1.45-15.13		0.02
ABCC2 aplotipo I																	
0	35	1.31	0.35-2.72	0.04	0.02	3.04	1.49-27.90	0.3	0.4	3.13	1.09-15.91	0.2	0.1	6.59	1.86-15.13	0.02	0.02
1	31	0.91	0.24-3.76		0.08	3.31	0.46-52.72		0.4	3.73	0.90-14.01		0.6	4.89	1.45-12.50		0.3
2	5	0.61	0.42-0.88		ref	2.90	1.79-6.57		ref	4.29	3.31-7.69		ref	3.67	3.13-3.84		ref
ABCC2 aplotipo II																	
0	45	1.10	0.32-3.76	0.8	0.9	3.16	1.46-52.72	0.8	0.2	3.33	1.09-15.91	0.1	0.08	5.31	1.86-15.13	0.1	0.08
1	23	0.86	0.24-2.73		0.5	3.24	0.46-17.41		0.2	4.37	0.90-10.35		0.03	4.10	1.45-12.50		0.03
2	3	1.02	0.83-1.73		ref	1.93	1.49-4.39		ref	2.31	1.47-2.53		ref	8.85	7.83-9.58		ref
0+1	68	1.04	0.24-3.76		0.8	3.08	0.46-52.72		0.2	3.56	0.90-15.91		0.05	5.20	1.45-15.13		0.05

ABCC2																		
IVS23+56C>T																		
CC	24	0.95	0.24-3.76	0.06	0.03	3.01	0.46-52.72	0.7	0.5	3.92	0.90-14.01	0.3	0.04	4.24	1.45-12.50	0.06	0.01	
CT	36	0.90	0.32-2.72		0.01	3.22	1.46-27.90		0.6	3.65	1.09-15.91		0.04	5.08	1.86-15.13		0.004	
TT	11	1.48	0.63-2.26		ref	3.21	2.43-7.89		ref	2.23	1.29-5.75		ref	8.62	3.81-12.76		ref	
CC+CT	60	0.90	0.24-3.76		0.01	3.10	0.46-52.72		0.5	3.65	0.90-15.91		0.03	4.81	1.45-15.13		0.003	
ABCG2 CACTdel																		
+/+	15	1.03	0.24-2.72	0.9	0.8	3.04	1.46-7.49	0.3	0.2	3.07	1.60-10.35	0.3	0.2	6.62	1.45-15.13	0.01	0.1	
+/-	41	1.02	0.32-2.73		0.7	2.98	0.46-27.90		0.09	3.23	0.90-15.91		0.2	5.61	1.86-14.73		0.1	
-/-	15	1.10	0.53-3.76		ref	4.16	1.90-52.72		ref	4.82	1.29-14.01		ref	3.73	2.63-12.76		ref	
ABCG2 15622C>T																		
CC	41	1.03	0.24-2.73	0.6	0.2	3.04	0.46-27.90	0.07	0.4	3.85	0.90-15.91	0.3	0.5	5.31	1.45-14.73	0.1	0.08	
CT	26	1.07	0.35-3.76		0.3	3.22	1.49-52.72		0.5	3.15	1.47-14.01		0.2	6.39	1.97-15.13		0.05	
TT	4	0.76	0.63-1.29		ref	3.73	3.20-5.31		ref	4.94	2.57-8.00		ref	2.98	2.63-5.27		ref	
CC+CT	67	1.04	0.24-3.76		0.27	3.04	0.46-52.72		0.45	3.33	0.90-15.91		0.32	5.61	1.45-15.13		0.06	
ABCG2 1143C>T																		
CC	46	1.04	0.24-2.73	0.6	0.3	2.94	0.46-27.90	0.05	0.4	3.51	0.90-15.91	0.5	0.4	5.46	1.45-15.13	0.1	0.06	
CT	21	1.10	0.35-3.76		0.2	3.24	1.49-52.72		0.6	3.20	1.47-14.01		0.2	6.03	1.97-9.96		0.08	
TT	4	0.76	0.63-1.29		ref	3.73	3.20-5.31		ref	4.94	2.57-8.00		ref	2.98	2.63-5.27		ref	
ABCG2 aplotipo I																		
0	30	0.88	0.32-3.76	0.9	ref	3.20	1.72-52.72	0.7	ref	4.05	1.29-14.01	0.3	ref	3.83	2.00-12.76	0.004	ref	
1	33	1.04	0.37-2.73		0.5	3.04	0.46-27.90		0.7	3.16	0.90-15.91		0.1	6.59	1.86-15.13		0.02	
2	8	1.07	0.24-2.15		0.7	3.10	1.46-7.49		0.9	3.28	1.60-10.35		0.6	6.78	1.45-12.14		0.2	
1+2	41	1.04	0.24-2.73		0.5	3.04	0.46-27.90		0.8	3.16	0.90-15.91		0.1	6.62	1.45-15.13		0.016	
SLCO1B1 388A>G																		
AA	28	1.18	0.42-2.73	0.3	ref	3.10	1.46-17.41	0.6	ref	2.79	1.47-7.29	0.3	ref	6.66	2.90-15.13	0.3	ref	
AG	32	0.86	0.24-3.76		0.047	2.98	0.46-52.72		0.9	4.27	0.90-15.91		0.01	3.88	1.45-14.73		0.02	
GG	11	0.86	0.35-2.15		0.3	3.41	2.11-7.49		0.5	3.48	1.61-8.00		0.1	4.40	2.00-9.96		0.1	
AG+GG	43	0.86	0.24-3.76		0.047	3.20	0.46-52.72		0.8	4.08	0.90-15.91		0.009	3.92	1.45-14.73		0.01	
SLCO1B1 521T>C																		
TT	52	1.04	0.24-3.76	0.3	0.09	3.18	1.46-52.72	1.0	0.4	3.40	1.29-14.01	0.3	0.02	5.41	1.45-15.13	0.3	0.03	

TC	17	0,86	0,37-1.87	0.046		3.04	0.46-27.90	0.5	4.26	0.90-15.91		0.046	5.27	1.86-12.50		0.03	
CC	2	1,93	1,73-2.13	ref		2.65	1.88-3.41	ref	1.35	1.09-1.61		ref	12.35	9.96-14.73		ref	
TC+TT	69	1.02	0.24-3.76	0.07		3.16	0.46-52.72	0.4	3.55	0.90-15.91		0.026	5.27	1.45-15.13		0.03	
CYP3A4*1B																	
AA	66	0.97	0.24-2.73	0.2	0.1	3.04	0.46-27.90	0.02	0.009	3.32	0.90-15.91	0.2	0.045	5.46	1.45-15.13	0.2	0.3
AG	5	1.66	0.73-3.76		ref	5.93	4.39-52.72		ref	8.14	2.53-14.01		ref	3.72	2.05-9.58		ref
CYP3A5*3																	
GG	66	1.04	0.24-3.76	0.7	0.3	3.10	0.46-52.72	0.6	0.6	3.40	0.90-15.91	0.6	0.3	5.46	1.45-15.13	0.2	0.05
GA	5	0.76	0.42-1.34		ref	3.89	1.79-7.64		ref	4.29	2.84-10.10		ref	3.13	2.05-6.62		ref

[^]Kruskal Wallis test

^{^^}U-Mann Withney test

** ABCC2 1019G>C è in perfetto LD con ABCC2 1549G>A

[§] Il genotipo/aplotipo di riferimento più idoneo per il confronto è stato scelto di volta in volta in base a valutazioni funzionali e statistiche

5. DISCUSSIONE

I farmaci antitumorali comunemente impiegati nella terapia dei pazienti oncologici presentano una significativa variabilità interindividuale, sia per quanto riguarda gli effetti tossici a carico dei tessuti non neoplastici, sia per quanto riguarda la risposta della cellula tumorale. Tale variabilità intersoggettiva è determinata da diversi fattori fra cui si possono includere anche le caratteristiche genetiche individuali. La farmacogenetica, analizzando la correlazione tra genotipo e fenotipo del paziente, ha l'obiettivo di definire la relazione esistente tra una determinata variazione polimorfica e l'alterazione dell'effetto di un specifico farmaco che ne consegue, individuando in tal modo validi marker genici predittivi che, una volta convalidati, possono poi essere impiegati a livello clinico per personalizzare ed ottimizzare la terapia, diminuendone la tossicità ed incrementandone nel contempo l'efficacia.

In questo ambito di studi, svolge un ruolo fondamentale la ricerca traslazionale ovvero un tipo di ricerca dove si realizzano le sinergie tra ricerca di base e ricerca clinica. In particolar modo, grazie a tale collaborazione, da un lato la sperimentazione di base ha la possibilità di trasferire a livello clinico, e convogliare così nella fase attuativa, tutto quel bagaglio di conoscenze ed innovazioni che ha sviluppato tramite l'attività di laboratorio; dall'altro lato le stesse applicazioni cliniche possono fungere da importante stimolo per la ricerca fondamentale e consentire così dei progressi reali e concreti in campo medico. Lo scopo finale della ricerca traslazionale risulta, quindi, quello di apportare un beneficio ed un miglioramento nella cura del paziente, giungendo alla definizione per ciascun individuo del trattamento più idoneo ed efficace, obiettivo particolarmente importante soprattutto in campo oncologico. Progetti di questa entità necessitano di un approccio multidisciplinare e devono avvalersi, quindi, di differenti figure professionali, fra cui il biotecnologo medico, capaci di interagire in maniera consapevole ed efficace sia con la realtà sperimentale di base che col mondo clinico.

Nell'ambito di una ricerca di tipo traslazionale si colloca anche lo studio di farmacogenetica esposto in questa tesi, intrapreso allo scopo di determinare il ruolo delle caratteristiche genetiche individuali nell'influenzare l'esito clinico di una terapia con irinotecano, impiegato in associazione con fluoropirimidine (FOLFIRI), in pazienti con CCR metastatico. L'irinotecano è un profarmaco, derivato semisintetico della campotecina, appartenente alla famiglia degli inibitori della topoisomerasi I, che viene trasformato in vivo nel suo metabolita attivo SN-38. Tale composto, sviluppato a partire dagli anni sessanta ed oggi ampiamente impiegato per il trattamento di varie forme neoplastiche, tra cui principalmente il CCR

metastatico, nonostante la sua provata efficacia antitumorale, presenta degli effetti tossici particolarmente significativi, sia di tipo ematologico, tra cui soprattutto la neutropenia, che non ematologico, in particolar modo la diarrea, ed una notevole variabilità intersoggettiva nella risposta al trattamento che ne rendono spesso complicato l'utilizzo nella pratica clinica. Una volta somministrato al paziente, l'irinotecano va incontro ad un complesso pathway metabolico, caratterizzato da diversi processi biochimici tra di loro altamente connessi ed associati. Un'alterazione geneticamente determinata della funzionalità o del grado di espressione di tutte le proteine coinvolte in questi molteplici processi biologici caratterizzanti il CPT-11, può contribuire alla variabilità intersoggettiva che si osserva nel profilo farmacologico del farmaco stesso. In particolare, nel mondo scientifico e a livello degli organi regolatori internazionali del farmaco, grande attenzione è stata posta sul ruolo della variante UGT1A1*28 come marker predittivo dell'esito della terapia con irinotecano ipotizzando un suo utilizzo per la definizione di una terapia personalizzata. In questo ambito il nostro gruppo ha prodotto importanti risultati che sottolineano la rilevanza di questo determinante genico [115, 240, 241]. Nel lavoro di questa tesi, si è voluta ampliare l'analisi farmacogenetica dell'irinotecano andando a considerare il ruolo di polimorfismi genici di proteine coinvolte principalmente in tre processi: il metabolismo ossidativo (CYP3A4, CYP3A5), il processo di inattivazione e detossificazione (UGT1A1, UGT1A7, UGT1A9) e l'escrezione e l'uptake cellulare del farmaco e dei suoi metaboliti (OATP1B1, MDR1, MRP1, MRP2, BCRP). Lo studio retrospettivo, condotto su 250 pazienti con CCR metastatico arruolati prospetticamente e omogeneamente trattati con irinotecano in associazione a fluoropimiridine (regime FOLFIRI), ha analizzato il ruolo delle varianti genetiche nel modulare diversi aspetti dell'esito clinico del trattamento: la tossicità ematologica e non ematologica durante il primo ciclo di terapia e durante l'intero corso del trattamento, con particolare attenzione a neutropenia e diarrea, il grado di risposta tumorale, il tempo alla progressione e la sopravvivenza del paziente. Un'analisi preliminare è stata effettuata anche per valutare l'effetto degli stessi markers genici nell'influenzare aspetti farmacocinetici in modo da ottenere informazioni utili all'interpretazione delle associazioni cliniche osservate. L'elevata numerosità del campione d'indagine ha permesso, inoltre, di esaminare la validità e possibilmente la superiorità dell'approccio aplotipico, che consente di analizzare simultaneamente l'effetto combinato di più varianti genetiche, rispetto all'analisi di singoli polimorfismi. In breve si sono identificati i seguenti determinati genici 1) *Tossicità ematologica (neutropenia)*: un rischio differenziale di sviluppare effetti avversi acuti e/o cumulativi si è dimostrato essere associato a varianti di UGT1A (UGT1A7*3, UGT1A9*22,

UGT1A aplotipo I) e dei trasportatori ABCC1 (1303C>A), ABCC2 (aplotipo II) e ABCG2 (aplotipo I) 2) *Tossicità non ematologica (diarrea)*: un ruolo predittivo importante è stato evidenziato per alcuni markers genici dei trasportatori con un maggior rischio di eventi avversi acuti e/o cumulativi correlato a ABCC1 (1684C>T, IVS18-30G>C) e ABCG2 (15994G>A) e, al contrario, un minor rischio associato a ABCC2 (1023G>A) 3) *Risposta tumorale*: UGT1A1*28 è risultato l'unico determinante genetico predittivo del CB; lo stesso polimorfismo assieme ad altri markers genetici di UGT1A (aplotipo II) e di proteine trasportatrici ABCC1 (2012G>T), ABCC2 (1249G>A, aplotipo II), ABCG2 (-15622C>T, ABCG2 -15994G>A, aplotipo III) e OATP1B1 (-11187G>A), sono risultati significativi nel modulare la risposta obiettiva alla terapia .4) *TTP*: un ruolo prognostico è stato dimostrato per UGT1A1*28 e UGT1A aplotipo II, entrambi correlati con un minor rischio di andare incontro a progressione di malattia.

L'incidenza della tossicità osservata globalmente in questo lavoro, è inferiore rispetto a quella riferita da Douillard et al. [81] ma in accordo con i dati pubblicati per il regime FOLFIRI [227, 242]. Anche il grado di risposta obiettiva raggiunto in questo studio è abbastanza comparabile con quanto riportato in letteratura per il trattamento con irinotecano in combinazione con fluorouracile [81].

Un ruolo fondamentale nel pathway biochimico del CPT-11 è svolto dal meccanismo di detossificazione ed eliminazione del farmaco, che prevede la trasformazione del metabolita attivo SN-38 nel suo derivato inattivo tramite una reazione di coniugazione con una molecola di acido glucuronico catalizzata da enzimi appartenenti alla famiglia UGT1A e principalmente dalle isoforme UGT1A1, UGT1A7 e UGT1A9. La glucuronidazione è una reazione metabolica di fase II che conferisce polarità a substrati lipofili, sia endogeni che esogeni, facilitandone l'eliminazione dal corpo. Questo step metabolico, quindi, non solo inattiva il farmaco ma è utile anche nella trasformazione dell'SN-38 in un metabolita più solubile in acqua e, quindi, meglio escreto attraverso la bile e le urine; il glucuronide formatosi, SN-38G, risulta il metabolita dell'irinotecano più presente nel plasma e nelle urine [56]. Proprio le urine sono la principale via di eliminazione dell'SN-38 coniugato [37] seguita dall'eliminazione biliare; nelle feci si è invece trovata una minor presenza dell'SN-38G [61], probabilmente associata all'attività idrolitica delle β -glucuronidasi batteriche presenti a livello enterico che convertono l'SN-38G eliminato nel lume intestinale nel metabolita attivo SN-38 [37]. Il grado di funzionalità del processo di glucuronazione ed inattivazione di SN-38 svolge un ruolo importante nel determinare l'attività citotossica dello stesso metabolita attiva. Polimorfismi genici di UGT1A1, UGT1A7 e UGT1A9, con un impatto rilevante sulla

capacità di glucuronazione delle rispettive isoforme enzimatiche, possono, quindi, portare a differenze nell'outcome clinico di una terapia con irinotecano. Lo studio di farmacogenetica di questa tesi ha evidenziato, in accordo con questa ipotesi, alcune correlazioni genotipo-fenotipo particolarmente significative.

Per l'isoforma UGT1A1 sono stati investigati i tre polimorfismi *28, *60 e *93. Fra queste varianti genetiche, i risultati più importanti si sono ottenuti per il marker UGT1A1*28 caratterizzato dall'inserzione di un microsatellite TA nella regione regolatoria TATA box del promotore del gene UGT1A1. L'allele polimorfico presenta sette ripetizioni TA al posto di sei ed è stato correlato ad una ridotta espressione della proteina e ad una significativa diminuita attività di glucuronazione [55, 111, 112, 113]. L'analisi farmacogenetica effettuata in questa tesi ha evidenziato il ruolo fondamentale di UGT1A1*28 come determinante genetico di risposta al trattamento sia in termini di clinical benefit (CB, CR + PR + SD) che di response rate (RR, CR + PR). In particolare i pazienti con genotipo *28/*28, rispetto ai pazienti con genotipo *1/*1, hanno mostrato una probabilità 4.68 volte maggiore di raggiungere un beneficio clinico dalla terapia (OR=4.68 95%CI: 1.03-21.22, p=0.04) e 3.43 volte superiore di raggiungere una risposta obiettiva (95%CI: 1.20-9.83, p=0.02). UGT1A1*28 è, inoltre, risultato essere anche un marker predittivo del tempo alla progressione tumorale: gli individui con genotipo *28/*28 mostrano un tempo alla progressione tumorale mediano significativamente più lungo rispetto ai soggetti wild-type, (10.5 vs 7.4 mesi; HR=0.56 95%CI: 0.33-0.96, p=0.03). Questi risultati dimostrano globalmente che il polimorfismo UGT1A1*28 è associato ad una maggior efficacia della terapia. I dati di letteratura riguardo all'impatto di questa variante genetica sulla risposta tumorale, sebbene tendenzialmente in accordo con i dati esposti in questa tesi, sono ancora del tutto preliminari e non portano, quindi, a conclusioni definitive [108, 122]. Tuttavia si può presupporre che il migliore outcome della terapia osservato in pazienti con genotipo *28/*28 sia legato alla minore attività di glucuronazione dell'enzima con conseguente minore inattivazione intratumorale di SN-38 che può quindi esercitare una maggiore attività citotossica. Sebbene tale ipotesi necessiti di ulteriori conferme, l'associazione tra lo status omozigote polimorfico ed una maggiore probabilità di sviluppare una risposta positiva al trattamento trova riscontro anche nei risultati ottenuti dall'analisi farmacocinetica. Il genotipo variante si è dimostrato correlato ad un significativo decremento (approssimativamente del 50%) nel rapporto di glucuronazione (AUC SN-38G/AUC SN-38) sia rispetto al genotipo wild-type che eterozigote. Questi dati sono in accordo con precedenti studi di letteratura [106, 116, 118]. Inoltre è stata trovata anche una significativa associazione tra il genotipo *28/*28 ed un marcato incremento

dell'indice biliare. L'indice biliare considera il rapporto tra le AUC di tutte le specie (CPT-11, SN-38 e SN-38G) e per questo motivo può essere ritenuto il miglior marker predittivo per il metabolismo dell'irinotecano fornendo importanti indicazioni riguardo le associazioni genotipo-fenotipo riscontrate clinicamente. La variante genetica ha dimostrato, infine, anche un impatto sull'AUC di SN-38G, il cui valore tende a decrescere all'aumentare del numero di alleli polimorfici, mentre nessun effetto è stato rilevato in relazione all'AUC di SN-38.

La maggior parte dei dati in letteratura è concorde ad indicare per il polimorfismo UGT1A1*28 un ruolo particolarmente importante nel modulare la tossicità sia ematologica che non ematologica riscontrata a seguito di terapia con irinotecano [119]. Tre recenti meta-analisi hanno tuttavia evidenziato come tale effetto sia evidente, o comunque assuma una maggior rilevanza clinica, quando il farmaco è impiegato a dosi elevate (>200/250mg/m²). Considerato che nello studio esposto in questa tesi l'irinotecano è stato somministrato ad una dose intermedia di 180mg/m², ciò potrebbe spiegare come mai i modelli predittivi ottenuti dall'analisi multivariata in questo studio non abbiano evidenziato l'UGT1A1*28 come marker di tossicità.

Per il gene UGT1A1 si sono considerate altre due varianti del promotore, l'UGT1A1*60 e l'UGT1A1*93, correlate alla presenza di UGT1A1*28 da una stretta associazione di LD, ed associate ad una diminuita espressione dell'enzima [105, 123, 125, 126]. Benché per tali varianti genetiche, nel lavoro di questa tesi, siano state rilevate le medesime tendenze di associazione dell'UGT1A1*28 rispetto ai parametri farmacocinetici studiati, lo sviluppo di modelli predittivi non ha evidenziato alcun ruolo significativo nel modulare aspetti farmacodinamici di terapia con irinotecano.

Per l'isoforma UGT1A7, l'analisi multivariata dei dati ha indicato il polimorfismo UGT1A7*3 come markers predittivo di tossicità ematologica durante il primo ciclo di terapia. In particolare i pazienti con genotipo *3/*3 risultano maggiormente esposti allo sviluppo di eventi avversi di tipo ematologico rispetto ai pazienti con genotipo wild-type (OR=4.13 95%CI:1.03-16.50, p=0.04). Un effetto analogo è stato osservato per la neutropenia: possedere due alleli UGT1A7*3, rispetto ad averne uno o nessuno, predispone a un rischio 5.47 volte maggiore di sviluppare neutropenia di grado severo durante il primo ciclo di trattamento (95%CI: 1.48-20.22, p=0.01). La tossicità ematologica e la neutropenia cumulativa, le reazioni avverse di tipo non ematologico e/o la diarrea così come altri aspetti farmacodinamici non sono risultati essere influenzati da questo determinante genico.

L'allele UGT1A7*3 rappresenta la combinazione di tutti i cinque siti polimorfici descritti nella popolazione caucasica per questa isoforma (387T>G, 391C>A, 392G>A33C>A e

622T>C, vedi “Introduzione” per dettagli) ed è stata associata *in vitro* ad una consistente perdita di attività catalitica dell’enzima con una conseguente diminuzione della glucuronazione di SN-38 [53, 127, 128]. L’isoforma UGT1A7 non è espressa nel fegato ma in altri tessuti extrahepatici come il tratto gastrointestinale [128, 243], e può, quindi, rappresentare un sistema periferico di glucuronazione e inattivazione del metabolita attivo. Gli effetti avversi di tipo ematologico osservati durante le fasi iniziali della terapia possono quindi essere collegabili ad una minor espressione enzimatica e di conseguenza ad una meno importante attività di glucuronazione dell’UGT1A7 che può provocare un aumento della concentrazione plasmatica dell’SN-38, metabolita attivo e tossico dell’irinotecano che probabilmente nel plasma esercita la sua azione nociva soprattutto nei confronti dei leucociti, provocando effetti ematologici e neutropenia acuta. Questo è in accordo anche con i dati di farmacocinetica che hanno evidenziato un ruolo significativo della variante UGT1A7*3 nel modulare GR e BI. In particolare all’aumentare degli alleli polimorfici si registra una diminuzione statisticamente significativa del GR e, al contrario, un aumento del BI. L’effetto di UGT1A7*3 sulla farmacocinetica di SN-38 è concorde con quanto osservato in studi condotti su pazienti asiatici [129, 130, 131]. I dati di letteratura riguardanti il ruolo di questo polimorfismo nel modulare la tossicità di irinotecano sono, invece, alquanto eterogenei sia per il segno dell’associazione riscontrata che per il tipo di evento tossico correlato [108, 110, 130, 132]; probabilmente ciò è dovuto alle differenze esistenti tra gli studi pubblicati sia per quanto riguarda le modalità del trattamento con irinotecano che per le caratteristiche della popolazione oncologica considerata. Tuttavia, in maniera concorde al risultato evidenziato in questa tesi, un recente lavoro condotto su 105 pazienti caucasici con CRC trattati con differenti regimi contenenti irinotecano ha indicato una associazione tra UGT1A7*3 e lo sviluppo di tossicità severa [132].

Per l’isoforma UGT1A9, che è altamente espressa a livello del fegato e nel tratto gastrointestinale e presenta una capacità di glucuronazione dell’SN-38 *in vitro* 2 volte maggiore dell’UGT1A1 e 10 volte maggiore dell’UGT1A7 [53], si è investigato il polimorfismo UGT1A9*22. Questa variante genetica è caratterizzata dall’inserzione di una timina nella regione promotrice del gene, in posizione -118 dall’ATG di inizio (-118T₉>10) ed è stata correlata *in vitro* ad una maggiore attività enzimatica per A(T)₁₀AT rispetto A(T)₉AT [133], anche se i dati sono ancora piuttosto controversi [134, 135]. Diversi lavori pubblicati negli ultimi anni hanno suggerito un ruolo di UGT1A9*22 nell’influenzare la tossicità, soprattutto di tipo non ematologico, e preliminarmente il grado di risposta alla terapia con irinotecano, generando però dei dati piuttosto eterogenei probabilmente legati alle diverse

condizioni clinico-sperimentali caratterizzanti i diversi trials [108, 110, 130, 131]. Lo studio intrapreso in questa tesi allo scopo di evidenziare eventuali correlazioni genotipo-fenotipo significative, ha indicato il polimorfismo UGT1A9*22 come un importante marker predittivo dello sviluppo di tossicità ematologica durante l'intero corso della terapia. I pazienti con genotipo *22/*22, rispetto a quelli con genotipo wild-type, presentano un rischio significativamente inferiore di andare incontro ad eventi avversi severi cumulativi di tipo ematologico (OR=0.20 95%CI: 0.05-0.81, p=0.02). Se si assume che la forma variante UGT1A9*22 sia associata ad una maggior attività enzimatica [133], si può ipotizzare che una aumentata inattivazione del metabolita attivo svolga un ruolo protettivo nei confronti dello sviluppo di tossicità ematologica cumulativa in quanto favorisce, con il susseguirsi dei cicli di terapia, una incrementata detossificazione di SN-38 che riduce così l'esposizione sistemica allo stesso metabolita tossico. Non essendo state evidenziate in questo lavoro di tesi correlazioni importanti tra questo polimorfismo e i parametri farmacocinetici, tale ipotesi rimane da convalidare in ulteriori studi. A supporto dell'effetto clinico osservato, si può comunque indicare che alcune analisi condotte in popolazioni asiatiche dimostrano un'associazione tra la presenza del polimorfismo UGT1A9*22 ed un minore AUC di SN-38 e BI e, al contrario, un maggiore GR [130, 131]. Per questo markers genico non sono stati rilevati altri effetti farmacodinamici importanti.

Grazie alla numerosità del campione d'indagine si è potuto effettuare anche uno studio di LD che ha confermato l'esistenza di un elevato grado di correlazione fra tutte le varianti genetiche di UGT1A analizzate ($0.6891 < D' < 1.0000$; $0.1841 < r^2 < 0.8278$) ed, in particolare, fra i siti polimorfici della stessa isoforma. Ciò è in accordo con i dati bibliografici [108, 109, 110, 123, 136]. E' quindi possibile che alcuni fenotipi legati a variazioni nell'attività di glucuronazione non siano riconducibili a singole varianti geniche ma a loro complesse combinazioni aplotipiche. In linea con questa osservazione, il lavoro esposto in questa tesi ha dimostrato un effetto clinicamente rilevante per due degli aplotipi di UGT1A individuati, l'aplotipo I e II, risultati essere anche i più prevalenti nella nostra popolazione d'indagine (frequenza di 34.2% e 23.2%, rispettivamente). Nello specifico, l'aplotipo I è risultato essere un marker predittivo dello sviluppo di tossicità ematologica, e in particolar modo neutropenia, durante l'intero corso del trattamento; pazienti con almeno un allele variante risultano protetti dal rischio di manifestare sia eventi ematologici severi in generale (OR=0.40 95%CI: 0.19-0.83, p=0.01) che neutropenia di grado G3-G4 (OR=0.47 95%CI: 0.22-0.98, p=0.04). L'aplotipo I è costituito da tutte le forme polimorfiche associate ad una elevata funzionalità di glucuronazione (stato wild-type per tutte le varianti genetiche tranne per UGT1A9*22

presente nello stato variante) e può, quindi, determinare un maggior grado di inattivazione e detossificazione del metabolita tossico SN-38 svolgendo di conseguenza un ruolo protettivo verso lo sviluppo di reazioni avverse. Ciò è in accordo anche con l'analisi farmacocinetica di questa tesi che ha evidenziato una diminuzione marginalmente significativa dell'AUC di SN-38 all'aumentare del numero di alleli recanti l'aplotipo I presentati dal paziente. Per quanto riguarda l'aplotipo II di UGT1A si è visto essere un marker importante dell'efficacia della terapia sia in termini di risposta obiettiva che di tempo alla progressione tumorale. Pazienti che presentano due alleli con l'aplotipo II, hanno una probabilità 9.90 volte maggiore di ottenere una risposta obiettiva rispetto a quelli con nessun allele con aplotipo II (95%CI: 2.01-48.67, $p=0.005$). È interessante osservare come l'impatto dell'aplotipo II sulla risposta tumorale sia significativamente più forte e rilevante rispetto a quello osservato per il singolo marker UGT1A1*28 (OR di 9.90 e 3.43 rispettivamente). La presenza di almeno un allele con aplotipo II di UGT1A, è stata, inoltre, associata anche ad un migliore tempo di progressione di malattia; il tempo di progressione mediano è risultato essere di 9.03 mesi per i pazienti che mostrano almeno un allele dell'aplotipo II e di 7.4 mesi per i soggetti con nessuna copia del medesimo allele (HR=0.71 95%CI 0.53-0.95, $p=0.02$). L'aplotipo II è costituito da tutte le forme polimorfiche a bassa funzionalità di glucuronazione (stato variante per tutti i markers genici tranne per UGT1A9*22 presente nella forma wild-type). Tale effetto fenotipico è in accordo con i risultati ottenuti dall'analisi farmacocinetica che evidenziano un'associazione significativa fra l'aumento del numero di alleli con aplotipo II ed una riduzione della forma glucuronidata di SN-38. Si può presupporre che la presenza dell'aplotipo II porti ad una minore glucuronazione e inattivazione di SN-38 a livello tumorale con conseguente aumento dell'efficacia della terapia. Tale ipotesi deve essere validata da ulteriori analisi. Sebbene i risultati ottenuti debbano considerarsi come preliminari, il lavoro di questa tesi ha dimostrato come l'approccio aplotipico sia una valida strategia per descrivere il complesso effetto della variazione dell'attività di UGT1A geneticamente determinata e delle relative ripercussioni su aspetti farmacodinamici e farmacocinetici di terapia con irinotecano.

Un altro aspetto fondamentale nel modulare l'effetto farmacologico dell'irinotecano si è dimostrato essere legato al processo di trasporto del farmaco e/o dei suoi metaboliti. Evidenze sperimentali hanno dimostrato che la traslocazione di CPT-11, SN-38 ed SN-38G è mediata dall'azione coordinata di vari carriers di membrana sia con un ruolo di uptake (nello specifico OATP1B1, appartenente alla famiglia OATP) che di efflusso (in particolare MDR1, MRP1, MRP2 e BCRP appartenenti alla famiglia ABC proteins). In particolare, OATP1B1 sembra essere responsabile soprattutto dell'uptake di SN-38 dal plasma verso gli epatociti, mentre

l'eliminazione di CPT-11 e dei suoi metaboliti nella bile e nelle urine sembra essere mediata dall'attività coordinata di MDR1, MRP2 e BCRP. MRP1 è invece probabilmente coinvolto nell'efflusso di CPT-11 e SN-38 dalla cellula, ad esempio epatica, verso lo spazio interstiziale [59]. Negli ultimi anni grande interesse è stato posto all'approfondimento del ruolo dei trasportatori di membrana in relazione al trattamento farmacologico e alle conseguenze derivate da una loro alterazione funzionale geneticamente determinata. Dati preliminari in tal senso si sono ottenuti recentemente anche riguardo alla terapia con irinotecano, suggerendo, quindi, di inserire nello studio di farmacogenetica di questa tesi anche la valutazione dell'impatto clinico di polimorfismi genici di proteine carriers [59, 76, 77]. I lavori pubblicati in letteratura, pur evidenziando un coinvolgimento delle pompe di uptake e di efflusso nel modulare il trattamento con irinotecano, hanno generato fin'ora un pool di risultati piuttosto eterogeneo e ancora di carattere esplorativo che sicuramente necessita di ulteriori studi per definire e stabilire in maniera più precisa le relazioni genotipi-fenotipo clinicamente rilevanti. I trasportatori di membrana sono presenti in tessuti normali particolarmente importanti dal punto di vista farmacologico, come intestino, fegato reni e cervello, deputati all'assorbimento, al metabolismo e all'escrezione dei composti terapeutici; questa localizzazione conferisce a tali proteine un ruolo fondamentale nel modulare la clearance sistemica e locale del farmaco andando di conseguenza a determinare il grado di concentrazione dello stesso agente terapeutico sia nella circolazione sanguinea che a livello del target farmacologico d'interesse. Le molecole carriers sono espresse in maniera innata o acquisita pure nel tessuto tumorale, acquisendo, quindi, anche una rilevanza nello stabilire fenomeni di resistenza al trattamento [137, 138]. Altre caratteristiche peculiari dei trasportatori sono: una localizzazione cellulare polarizzata, importante per determinare la corretta traslocazione vettoriale dei substrati attraverso i vari tessuti, una polispecificità associata spesso ad una sovrapposizione di substrato, ed, infine, una forte sensibilità alla modulazione da parte di molteplici inibitori ed induttori [137, 138, 139, 140]. Nella traslocazione del CPT-11 e dei suoi metaboliti, come già accennato, sono coinvolti tutta una serie di molecole trasportatrici sia di uptake che di efflusso che presentano una distribuzione tissutale piuttosto ampia e la cui azione concertata determina, infine, il grado di trasferimento del farmaco dalla circolazione sistemica verso l'intestino e dal flusso sanguigno verso le vie escrettrici quali fegato e reni. Ognuna di queste proteine è implicata specificatamente nel trasporto di CPT-11, SN-38 e SN-38G, traslocando uno o più di questi substrati e/o mostrando per ciascuno di questi un diverso grado di attività; l'affinità evidenziata in certe condizioni può inoltre essere alterata da una variazione della concentrazione del substrato stesso o da fenomeni di saturazione. Inoltre, alcuni dati di

letteratura hanno evidenziato come il grado e l'efficienza di trasporto, e di conseguenza il suo impatto sugli esiti clinici della terapia, sia significativamente influenzato anche dalla funzionalità del processo di glucuronazione a cui risulta quindi altamente connesso [203, 244].

Questi dati relativi al ruolo delle varie pompe di membrana nel traslocare l'irinotecano e/o i suoi metaboliti così come il loro eventuale coinvolgimento in fenomeni di resistenza alla terapia, sono stati prodotti, prevalentemente, tramite studi *in vitro* non considerando quindi la complessità dei processi biologici e dell'environment tessutale che caratterizzano il paziente. La tossicità, soprattutto quella di tipo non ematologico, è il risultato di una combinazione di effetti sia locali che sistemici, entrambi potenzialmente modulabili, in maniera indipendente, da alterazioni dell'attività dei trasportatori di membrana. Per quanto riguarda l'efficacia del trattamento, oltre ai livelli sistemici di metabolita attivo circolante, va considerata anche la concentrazione tumorale raggiunta dal metabolita attivo ed il tempo più o meno prolungato di esposizione allo stesso. Inoltre per quanto riguarda la risposta tumorale e la chemiosensibilità, in aggiunta all'interazione tra trasportatore e farmaco, possono entrare in gioco altri meccanismi indiretti legati comunque all'attività di traslocazione delle proteine carrier; ad esempio i trasportatori possono provvedere al nutrimento della cellula neoplastica oppure influenzare il gradiente elettrochimico attraverso le membrane cellulari modulando così il pathway di apoptosi o l'efficienza di diffusione del farmaco all'interno della cellula stessa [245]. I carriers di membrana, inoltre, sono implicati fisiologicamente anche nella difesa dell'organismo da potenziali insulti tossici da parte di xenobiotici o altre molecole dannose svolgendo, di conseguenza, un ruolo fondamentale pure nel processo di carcinogenesi. In aggiunta, alcuni studi ipotizzano per i trasportatori un ruolo anche nella modulazione dell'aggressività tumorale e nella definizione della sua biologia, assumendo così globalmente un ruolo prognostico che può risultare confondente quando si cerchi di definire l'impatto predittivo sull'outcome della terapia farmacologica [140, 145, 149].

I dati ottenuti dal lavoro di questa tesi, riguardanti il ruolo di varianti polimorfiche dei geni legati al trasporto cellulare di irinotecano e dei suoi metaboliti, sono di seguito discussi.

MRP2, codificato dal gene ABCC2, è un trasportatore di efflusso, localizzato a livello apicale ed espresso soprattutto nel fegato e, in minor misura, in reni ed intestino. Tale proteina si è vista essere implicata principalmente nella traslocazione della forma glucuronata del metabolita attivo e forse, in maniera secondaria, di SN-38 e debolmente di CPT-11 [68, 150, 153, 158, 159, 160], assumendo così un ruolo chiave nel processo di escrezione urinaria e soprattutto epatobiliare di questi substrati.

L'analisi multivariata, relativa allo sviluppo di tossicità ematologica e neutropenia durante il primo ciclo di trattamento, ha evidenziato un ruolo significativo per l'aplotipo II di ABCC2. Pazienti con due alleli recanti l'aplotipo II, rispetto a tutti gli altri, hanno mostrato un rischio 9.14 volte maggiore di andare incontro ad effetti tossici ematologici acuti di grado G3-G4 (95%CI: 1.36-61.26, $p=0.02$) ed un rischio 8.50 volte maggiore di sviluppare, nello specifico, neutropenia severa (95%CI: 1.37-52.51, $p=0.02$). La determinazione degli aplotipi di ABCC2 è stata effettuata considerando la combinazione di sei siti polimorfici, -24C>T, 1249G>A, 3972C>T, -1549G>A, -1019A>G e IVS26-34T>C, risultati in relativo LD fra di loro nella popolazione caucasica [203]; l'aplotipo II, che rappresenta il secondo aplotipo più diffuso nella popolazione d'indagine (frequenza di 23.2%), è costituito dalla forma wild-type di tutte le varianti genetiche ad eccezione del marker 1249G>A presente nello stato polimorfico. Considerando i singoli polimorfismi, le evidenze sperimentali riguardo un loro possibile impatto sul fenotipo della proteina sono, ad oggi, piuttosto limitate e preliminari e riguardano essenzialmente tre varianti -24C>T, 1249G>A e 3972C>T (vedi "Introduzione"). Per l'alterazione missense 1249G>A (Val471Ile), ad esempio, studi *in vitro* ed *in vivo* hanno indicato un possibile effetto sull'espressione della proteina, con esiti però diversi in base al tessuto considerato, ed un'alterazione dell'attività di trasposto di diverse molecole e farmaci con un effetto substrato-specifico difficilmente definibile a priori [149, 172, 176]. Recenti dati di letteratura hanno suggerito anche per varie combinazioni dei polimorfismi che compongono l'aplotipo un possibile impatto, non però del tutto chiarito, sui livelli di espressione dell'mRNA o della proteina [176, 180, 197, 199, 200, 203]. Dai risultati emersi nel presente studio, si può tuttavia dedurre che la presenza di questa combinazione aplotipica determini un'alterazione dell'escrezione urinaria e soprattutto epatobiliare di SN-38G e forse SN-38, che globalmente porta ad uno sbilanciamento verso l'azione citotossica del metabolita attivo che si manifesta poi clinicamente con un aumento degli effetti tossici ematologici e, in particolare, della neutropenia. L'impatto dell'aplotipo II, inoltre, risulta evidente durante il primo ciclo di terapia mentre, col susseguirsi delle somministrazioni di irinotecano, è probabilmente compensato o mascherato da altri meccanismi biochimici subentrati in fase successive. Un supporto preliminare a questa ipotesi è fornito dall'analisi farmacocinetica che ha indicato un'associazione border-line fra la presenza di due alleli dell'aplotipo II ed una diminuzione del GR e, al contrario, un aumento del BI. Inoltre, diversi dati bibliografici evidenziano l'importanza di questi polimorfismi, considerati singolarmente, nel predire vari aspetti farmacocinetici e farmacodinamici di terapia con irinotecano [106, 114, 131, 179, 180, 181, 202] ed è quindi supponibile che l'aplotipo descriva proprio l'interazione combinata e

sinergica dell'effetto fenotipico apportato dalle singole varianti geniche. A conferma di ciò, alcuni studi di letteratura, condotti su pazienti caucasici, hanno indicato un impatto significativo dei sei polimorfismi, presenti simultaneamente in una combinazione atipica, nel modulare sia aspetti farmacocinetici che l'insorgenza di effetti tossici, quali diarrea o neutropenia, a seguito di terapia con irinotecano [203, 204].

Il lavoro di questa tesi ha evidenziato per l'aplotipo II di ABCC2 anche un ruolo nel determinare il grado di risposta tumorale. In particolare, i pazienti che presentano almeno un allele con aplotipo II hanno una minor probabilità di raggiungere una risposta obiettiva rispetto ai pazienti con nessun allele (OR=0.48 95%CI: 0.27-0.87, p=0.02). Benché l'interpretazione biologica di questa correlazione sia piuttosto complessa, presumibilmente l'attività del trasportatore associata all'aplotipo II, tramite la modulazione più o meno diretta del grado di clearance sistemica e tumorale o di altri processi molecolari, determina globalmente una situazione che non favorisce un'esposizione prolungata nel tempo al metabolita attivo diminuendo così l'efficacia antitumorale della terapia. Ad ogni modo, studi funzionali che definiscano in maniera precisa l'effetto dell'aplotipo II sul fenotipo della proteina, sono sicuramente necessari per comprendere l'esatto meccanismo biologico e farmacologico alla base dell'impatto clinico riscontrato.

Oltre all'aplotipo II, anche il singolo polimorfismo 1249G>A è risultato essere un significativo marker di risposta tumorale. In particolare, l'effetto riscontrato per la variazione 1249G>A, ovvero una minore chance di risposta associata all'allele variante 1249A (OR=0.45 95%CI: 0.25-0.81, p=0.007), è praticamente sovrapponibile a quella individuata per l'aplotipo II così come anche l'impatto sulla farmacocinetica del farmaco. Ciò è in accordo col fatto che l'aplotipo II presenta come unico marker in forma polimorfica proprio la variante 1249G>A.

L'analisi farmacogenetica di questa tesi, tra i polimorfismi di ABCC2 investigati in aggiunta ai sei costituenti l'aplotipo, ha indicato un ruolo predittivo importante per la variante –1023G>A, localizzata a livello della regione 5' del gene. In particolare la presenza dell'allele polimorfico –1023A è risultata essere associata ad una minore probabilità di sviluppare effetti tossici non ematologici durante l'intero corso del trattamento (OR=0.24 95%CI: 0.08-0.73, p=0.01). Considerato che l'effetto fenotipico di tale marker genico non è ancora stato definito, un supporto alla correlazione osservata può derivare solamente da una recente analisi farmacocinetica, condotta su pazienti asiatici, che ha evidenziato un ruolo del polimorfismo –

1023G>A nel modulare l'AUC di SN-38 con un minore esposizione al metabolita attivo associata all'allele variante -1023A.

BCRP, codificato dal gene ABCG2, è un altro trasportatore di efflusso, espresso oltre che nei trofoblasti della placenta anche a livello della membrana apicale degli enterociti dell'epitelio del piccolo intestino e del colon così come nelle membrane canaliculari epatiche e biliari. Diversi studi *in vitro* hanno dimostrato un forte coinvolgimento di tale proteina nel trasporto di SN-38, che rappresenta il principale substrato, e della sua forma glucuronata SN-38G, svolgendo anche un ruolo importante nel determinare fenomeni di resistenza agli stessi metaboliti [161, 162, 163, 164, 165]. Inoltre evidenze sperimentali hanno indicato che l'espressione del carrier di membrana è indotta dallo stesso trattamento con irinotecano stabilendo così una resistenza acquisita parzialmente reversibile [161, 166].

Lo studio di farmacogenetica di questa tesi ha confermato la rilevanza di ABCG2 nel modulare la terapia con irinotecano e ha evidenziato dei marcatori genici predittivi dell'esito clinico del trattamento particolarmente significativi.

Il polimorfismo -15994G>A, situato a livello della regione regolatoria al 5' del gene, è risultato essere un importante determinante genico di tossicità non ematologica acuta e dello sviluppo di diarrea severa sia durante il primo ciclo di terapia che durante l'intero corso del trattamento. In particolare, i pazienti con genotipo omozigote variante -15994AA, rispetto ai pazienti con genotipo wild-type -15994GG, durante il primo ciclo di terapia hanno un rischio significativamente maggiore di presentare sia effetti tossici non ematologici severi (OR= 20.28 95%CI: 3.76-109.38, p=0.0005) che, nello specifico, diarrea di grado G3-G4 (OR= 103.76 95%CI: 9.11-1181.29 p=0.0002), mentre durante l'intero corso del trattamento presentano una probabilità 9.08 volte superiore di sviluppare diarrea severa (95%CI 1.84-44.84, p=0.007). Bisogna evidenziare che l'intervallo di confidenza ottenuto è particolarmente ampio a causa della bassa prevalenza del polimorfismo nel nostro campione di studio e dei pochi eventi di diarrea severa osservati clinicamente (6 durante il primo ciclo di terapia e 21 durante l'intero corso del trattamento); questo importante dato preliminare dovrà ora essere validato in ulteriori analisi.

Per quanto riguarda l'effetto funzionale della variante -15994G>A, ad oggi esiste solo un dato sperimentale ottenuto dall'analisi di tessuti umani di fegato ed intestino di soggetti di razza bianca ed ispanica, che indica un'associazione tra la forma polimorfica ed un aumento dell'espressione del RNA di BCRP; studi *in silico* suggeriscono che tale effetto del polimorfismo sia correlato alla generazione di un sito di legame per HNF4, un fattore di trascrizione coespresso con BCRP in vari tessuti (es. fegato e intestino) [218]. Basandoci su

questa evidenza sperimentale, si può ipotizzare che un' aumentata espressione ed attività del trasportatore polimorfico a livello del tessuto epatico porti ad un incremento del grado di escrezione epatobiliare del metabolita attivo e del suo glucuronide; a livello intestinale, anche l'SN-38G, grazie all' azione β -glucuronidasi batteriche [37], può essere riconvertito nella forma tossica di SN-38 portando, quindi, globalmente ad un accumulo del metabolita attivo e di conseguenza ad un aumento del danno alla mucosa intestinale. Diversi dati di letteratura indicano come lo sviluppo di diarrea a seguito di terapia con irinotecano sia significativamente correlato proprio all' azione tossica di SN-38 a livello degli enterociti intestinali [56, 58, 72, 246, 247]. L' aumentata escrezione epatobiliare del metabolita attivo spiega probabilmente il ruolo di -15994G>A come marker predittivo dello sviluppo di diarrea severa, sia durante il primo ciclo di terapia che durante l' intero corso del trattamento, e degli effetti tossici non ematologici acuti. Per quanto riguarda il mancato impatto del polimorfismo sulla tossicità non ematologica cumulativa, si può presupporre che, con il susseguirsi dei cicli di somministrazione di irinotecano, subentrino altri meccanismi molecolari e biologici che annullano o comunque compensano l' effetto della variante genica -15994G>A.

Relativamente al coinvolgimento di BCRP nel modulare il rischio di sviluppare eventi avversi severi, nel lavoro di questa tesi si è evidenziato un ruolo significativo anche per l' aplotipo derivante dalla combinazione di tutti i siti polimorfici investigati per questa proteina ovvero 421C>A, 34G>A, -19572/19569 CTCAdel, -15994G>A, -15622C>T, 16702G>A e 1143C>T. L' esatto significato funzionale di questi markers genici non è ancora stato del tutto univocamente definito. Per i polimorfismi più studiati, come 421C>A e 34G>A, pur esistendo dati non sempre concordanti, la maggior parte delle evidenze sperimentali e cliniche suggerisce un loro impatto negativo sui livelli di espressione della proteina con un meccanismo però ancora da definire chiaramente ed un effetto spesso substrato-specifico [145, 172, 208, 210, 211, 212, 213]. Per le altre varianti genetiche, come -19572/19569 CTCAdel, -15994G>A, -15622C>T, 16702G>A e 1143C>T, essendo state descritte solo in tempi più recenti sussistono solo pochi dati preliminari che indicano comunque un maggior livello di espressione associato alla forma polimorfica di -15994G>A [218] e 16702G>A [218] e, al contrario, un minor livello di espressione per la forma variante di -15622C>T [218], 1143C>T [218] e -19572/19569 CTCAdel [181, 216, 217]. Benché esistano diverse evidenze cliniche che suggeriscono l' impatto di alcuni di questi markers genici nel modulare sia aspetti farmacocinetici che farmacodinamici di terapia con irinotecano [89, 131, 181, 214, 215, 221],

il ruolo predittivo della loro combinazione aplotipica, dimostrato in questo lavoro di tesi, è un risultato totalmente nuovo.

L'analisi statistica dei dati, ha evidenziato, in particolare, un impatto significativo dell'aplotipo I di ABCG2 nell'influenzare lo sviluppo di tossicità ematologica e neutropenia durante il primo ciclo di terapia: pazienti che presentano due alleli con aplotipo I, rispetto a tutti gli altri, mostrano un rischio 5.67 volte maggiore di sviluppare effetti tossici ematologici severi (95%CI: 1.24-25.93, $p=0.03$) e 6.27 superiore di presentare neutropenia di grado G3-G4 (95%CI: 1.36-28.85, $p=0.02$). Durante l'intero corso della terapia, il ruolo predittivo dell'aplotipo I perde di significatività in quanto, probabilmente, entrano in gioco altri fattori più determinati. L'aplotipo I di BCRP è quello più diffuso nella nostra popolazione d'indagine (frequenza del 30.4%) ed è costituito dalla forma wild-type di tutte e sette le varianti geniche considerate. In mancanza di dati funzionali, l'impatto fenotipico di questo aplotipo sull'attività del trasportatore è difficilmente ipotizzabile e di conseguenza non è facile individuare una spiegazione biologica che chiarisca l'associazione clinica riscontrata in questo lavoro. Ad ogni modo, un aiuto può derivare dall'analisi farmacocinetica, effettuata durante il primo ciclo di trattamento, che ha indicato una correlazione significativa fra la presenza di almeno un allele con aplotipo I ed un aumento del BI. L'incremento di tale parametro farmacocinetico, che fa presupporre un minor grado di eliminazione e quindi un conseguente accumulo del metabolita tossico SN-38, è in accordo col ruolo svolto dall'aplotipo I nel favorire l'insorgenza di effetti tossici ematologici acuti.

Per BCRP, il lavoro di questa tesi ha dimostrato un coinvolgimento significativo anche nel modulare l'esito della terapia in termini di risposta obiettiva. In particolare, l'analisi multivariata dei dati ha evidenziato un ruolo predittivo importante per due polimorfismi, -15994G>A e -15622C>T, e per l'aplotipo III. La presenza di almeno un allele variante -15622T è risultata essere associata a un minor grado di risposta tumorale (OR=0.52 95%CI 0.29-0.94, $p=0.03$) mentre l'allele polimorfico -15994G è risultato essere correlato ad una modesta aumentata probabilità di efficacia della terapia (OR=1.97 95%CI 1.05-3.69, $p=0.03$). Tale risultato è in accordo con l'impatto fenotipo opposto assegnato preliminarmente a tali markers genetici in un recente studio condotto su tessuti umani di fegato ed intestino. [218]. Per quanto riguarda l'aplotipo III di BCRP, i pazienti che presentano almeno un allele con questo aplotipo, rispetto a chi non ne possiede alcuna copia, manifestano una probabilità 2.37 volte maggiore di raggiungere una risposta obiettiva (95%CI 1.27-4.42, $p=0.007$). L'aplotipo III, con una frequenza del 15.4% nella nostra popolazione d'indagine, è costituito dalla forma

wild-type di tutte le varianti ad eccezione di -15994G>A e -19572/19569 CTCAdel presenti nello stato polimorfico. L'effetto combinato dei sette marker genici sul grado di funzionalità del trasportatore associato all'aplotipo III non è stato ad oggi definito. Lo studio farmacocinetico ha evidenziato per i singoli polimorfismi delle correlazioni border-line ed eterogenee.

Diversi dati sperimentali dimostrano come l'espressione di BCRP sia associata a fenomeni di resistenza all'irinotecano e ai suoi metaboliti; [161, 162, 163, 166]; inoltre l'espressione di questo carrier di membrana, anche a livello delle metastasi epatiche, sembra essere indotta dallo stesso trattamento con CPT-11 [161, 166]. Un limite di questi studi, tuttavia, è che essendo analisi *in vitro* condotte su linee cellulari umane di polmone e colon in condizioni sperimentali controllate, non considerano il complesso interplay di processi biologici in cui è coinvolto il trasportatore e non includono tutti quei fattori e meccanismi caratteristici di una situazione *in vivo* che possono influenzare e cooperare con l'attività di BCRP.

Diverse analisi, condotte per la maggior parte su pazienti con leucemia, hanno inoltre attribuito a BCRP anche un ruolo clinico prognostico [145]. Per quanto riguarda il tumore del colon, nonostante l'elevata espressione del trasportatore osservata a livello della membrana apicale degli enterociti del tratto gastrointestinale in condizioni normali, uno studio condotto su campioni biotipici ha indicato una significativa minor espressione di BCRP a livello del tessuto del carcinoma del colon e delle metastasi epatiche; inoltre la down regolazione della proteina è stata evidenziata anche in altri tumori solidi suggerendo globalmente che una diminuzione dell'espressione del trasportatore possa avere un ruolo nel processo di tumorigenesi. e di progressione tumorale [248]. Inoltre, è stato suggerito che l'espressione di BCRP a livello delle neoplasie umane, così come quella di altri carriers (es. MDR1), possa essere una componente fondamentale di un sistema molto ampio e complesso che va a determinare infine l'evoluzione tumorale modulando ad esempio il grado di instabilità genetica o l'acquisizione di immortalità o ancora processi quali la morte cellulare programmata, la proliferazione o la capacità di invasività e metastatizzazione [145].

In questo contesto ben si colloca il risultato del lavoro di questa tesi che ha evidenziato e confermato il ruolo significativo di BCRP e dei suoi marker genici nel modulare l'efficacia antitumorale della terapia con irinotecano. Tale effetto è probabilmente il risultato dell'azione congiunta dell'impatto diretto sull'efficacia del farmaco e del ruolo svolto dallo stesso trasportatore nel determinare la biologia e l'aggressività del tumore.

MRP1, codificato dal gene ABCC1, è un altro carrier di efflusso, espresso in maniera ubiquitaria in quasi tutti i tessuti dell'organismo ad eccezione del fegato dove è presente a

bassi livelli, e risulta collocato, a differenza di MDR1, MRP2 e BCRP, a livello della membrana basolaterale. Dati sperimentali indicano un debole coinvolgimento di questa proteina nella traslocazione di CPT-11, e forse di SN-38, [153, 155] con un ruolo di escrezione dalla cellula, ad esempio epatica, verso lo spazio interstiziale. Per il gene ABCC1 sono state descritte ad oggi diverse alterazioni nella sequenza nucleotidica; si tratta per lo più di variazioni silenti o situate in zone introniche o non codificanti adiacenti alle regioni di confine esone/introne. Le poche sostituzioni missense fin'ora individuate presentano una frequenza relativamente bassa e i soggetti portatori della variante sono essenzialmente eterozigoti. Inoltre l'effetto funzionale di tali polimorfismi non è ancora del tutto stato caratterizzato e anche riguardo alla loro rilevanza fisiologica e clinica esistono per ora solo pochi dati sparsi e preliminari [172]. Ad ogni modo, studi pubblicati recentemente in letteratura hanno suggerito un coinvolgimento di alcune varianti genetiche di MRP1 nell'influenzare aspetti farmacocinetici di terapia con irinotecano [106, 114] e, quindi, è stato deciso di inserire anche questo trasportatore nello studio farmacogenetico di questa tesi. L'analisi multivariata effettuata per rilevare eventuali associazioni genotipo-fenotipo significative ha generato diversi dati interessanti.

In entrambi i modelli, individuati per predire lo sviluppo di tossicità severa ematologica durante l'intero corso del trattamento, compare il polimorfismo 1303C>A con un maggior rischio associato alla presenza dello status genotipico 1303CA. Il medesimo effetto è stato riscontrato anche per la neutropenia cumulativa: pazienti con genotipo variante 1303CA, rispetto ai pazienti wild-type, mostrano un rischio 6.66 volte superiore di sviluppare neutropenia severa durante l'intero corso di terapia (95%CI 1.25-35.48, $p=0.03$). Non è stato identificato alcun paziente con genotipo omozigote variante 1303AA a causa della bassa prevalenza di questa variante genetica nei caucasici. I dati sperimentali riguardo l'effetto di tale polimorfismo missense sulla funzionalità del trasportatore sono ancora molto scarsi e del tutto inconclusivi e suggeriscono globalmente un impatto dal carattere substrato specifico [193, 194]; inoltre ad oggi non esiste alcuna indicazione bibliografica sull'effetto di 1303C>A in relazione a terapia con irinotecano.

Per quanto riguarda lo sviluppo di tossicità non ematologica e diarrea durante l'intero corso del trattamento, l'analisi statistica dei dati ha assegnato un ruolo predittivo importante a due markers genici di MRP1: la variante silente 1684C>T ed il polimorfismo intronico IVS18-30G>C. In particolare, i pazienti che presentano almeno un allele variante 1684T, rispetto a quelli wild-type, presentano un rischio 2.36 volte maggiore di andare incontro ad eventi tossici non ematologici severi cumulativi (95%CI 1.16-4.79, $p=0.02$) mentre la presenza

dell'allele variante IVS18-30C è risultata essere associata ad un rischio 2.67 volte superiore di sviluppare diarrea di grado G3-G4 considerando l'intero corso di trattamento (95%CI 1.06-6.73, $p=0.04$). Ad oggi non esiste nessun dato sperimentale riguardo l'effetto fenotipico di queste due varianti genetiche e, anche dal punto di vista clinico, è presente in letteratura solo un lavoro, condotto su pazienti con vari tumori solidi trattati con una dose elevata ($>300\text{mg/m}^2$) di irinotecano, che suggerisce un ruolo delle varianti 1684C>T e IVS18-30G>C nel modulare alcuni parametri farmacocinetici spiegando comunque solo in minima parte i risultati ottenuti in questa tesi [106].

I polimorfismi 1303C>A e 1684C>T sono, rispettivamente, una variazione missense ed una alterazione silente, che si può ipotizzare impattino l'attività del trasportatore modulando di conseguenza l'efflusso di CPT-11 e forse di SN-38 dalla cellula verso lo spazio interstiziale; l'alterazione delle concentrazioni relative dei vari substrati che ne deriva, probabilmente altera il grado di funzionalità di alcune vie metaboliche caratterizzanti l'irinotecano, quali ad esempio l'attivazione e la glucuronazione, risultando globalmente in un accumulo del metabolita attivo che, col susseguirsi delle somministrazioni di farmaco, si ripercuote clinicamente con un aumento delle tossicità ematologica e non ematologica cumulative. La variante IVS18-30G>C cade, invece, in una regione intronica del gene; il suo effetto fenotipico, difficilmente decifrabile in mancanza di dati sperimentali, può, quindi, derivare da una modifica dei processi che regolano il livello di espressione della proteina trasportatrice oppure può essere legato indirettamente all'effetto di un altro polimorfismo con cui si trova in LD. Ad ogni modo un dato preliminare pubblicato recentemente in letteratura indica un'associazione tra l'allele variante IVS18-30C e un aumento del GR [106] facendo presupporre uno sbilanciamento verso la presenza della forma glucuronata che, escretata a livello intestinale, può essere riconvertita nel metabolita attivo per mezzo delle β -glucuronidasi e dare i fenomeni di diarrea cumulativa di grado severo osservati dal lavoro di questa tesi. Inoltre un maggior grado del processo di glucuronazione, legato in maniera più o meno diretta alla presenza della forma polimorfica IVS18-30G>C, è in accordo anche con l'associazione fra un marginale aumento del rischio di progressione tumorale e la presenza dell'allele variante IVS18-30C (HR=1.33 95%CI: 1.00-1.77, $p=0.05$) individuata dall'analisi univariata.

Per quanto riguarda il ruolo di MRP1 nel modulare la risposta alla terapia con irinotecano, il lavoro di questa tesi ha evidenziato un ruolo significativo per il polimorfismo missense 2012G>T che compare in entrambi i modelli predittivi sviluppati. In particolare i pazienti con genotipo 2012GT presentano una probabilità circa due volte e mezza superiore di raggiungere

una risposta obiettiva rispetto ai pazienti wild-type. Anche in questo caso, come per 1303C>A, lo stato omozigote variante 2012TT non è stato individuato nella popolazione d'indagine a causa della bassa prevalenza di questa variante genetica nei caucasici. L'effetto funzionale e farmacologico di tale polimorfismo è ancora quasi del tutto sconosciuto ed esistono ad oggi solo pochissimi dati esplorativi che non portano ad alcuna conclusione definitiva [191, 192]; mancano, invece, del tutto dati sperimentali riguardo un possibile impatto della variante 2012G>T sull'esito clinico di terapia con irinotecano. Un preliminare supporto all'associazione riscontrata dal lavoro di questa tesi deriva comunque dall'analisi farmacocinetica che ha dimostrato una correlazione significativa tra lo stato variante 2012GT ed un aumento dell'AUC di SN-38G e di SN-38. Una maggiore esposizione al metabolita attivo può, in effetti, spiegare almeno parzialmente l'incremento della risposta tumorale osservata per i pazienti con genotipo 2012GT. Ad ogni modo servono sicuramente ulteriori evidenze sia funzionali che cliniche per comprendere meglio il ruolo del trasportatore MRP1 e delle sue varianti genetiche nel modulare l'efficacia della terapia.

Data la scarsità dei dati sperimentali esistenti ad oggi riguardo i polimorfismi di MRP1, tutte le ipotesi che sono state effettuate per spiegare le associazioni cliniche individuate devono essere prese con grande cautela e considerate del tutto preliminari.

OATP1B1, codificato dal gene *SLCO1B1*, è un carrier di uptake fegato-specifico, espresso a livello della membrana basolaterale degli epatociti, per il quale è stato ipotizzato anche un trasporto di carattere bidirezionale; i dati di letteratura hanno dimostrato un coinvolgimento di tale proteina nella traslocazione di SN-38 e, con minore affinità, pure di CPT-11 e forse SN-38G, [169, 170] attribuendo ad OATP1B1 un ruolo fondamentale per l'uptake dei suoi substrati dal plasma verso la cellula epatica.

L'analisi multivariata di questa tesi ha indicato il polimorfismo genico -11187G>A di OATP1B1 come marker predittivo di risposta al trattamento. In particolare, in entrambi i modelli di regressione logistica sviluppati per individuare i determinanti di risposta tumorale, i pazienti che presentano il genotipo variante -11187GA, rispetto a quelli wild-type, mostrano una probabilità significativa due volte maggiore di ottenere una risposta obiettiva alla terapia. L'analisi univariata ha inoltre dimostrato che i pazienti con status -11187GA esibiscono anche un tempo alla progressione mediano tendenzialmente maggiore rispetto ai pazienti wild-type (9.87 vs 7.47, HR=0.7 95%CI: 0.48-1.02, p=0.06). Lo stato omozigote variante -11187AA non è stato individuato nella popolazione d'indagine a causa della bassa prevalenza di questa variante genetica nei caucasici.

La variante genica -11187G>A, che cade a livello della regione 5' non tradotta del gene, è stata descritta solo in tempi relativamente recenti ed il suo effetto fenotipico non è ancora stato investigato in studi funzionali; tuttavia dati preliminari suggeriscono un'associazione tra la forma polimorfica ed una minore espressione di OATP1B1, con conseguente minore capacità di uptake epatico, [224] ed un ruolo importante dal punto di vista farmacologico anche in relazione a terapia con irinotecano [131, 223]. Assunta la minore attività di trasporto attribuita al carrier polimorfico, si può presupporre che la presenza della variante genica porti ad una diminuita capacità di uptake epatico dell'irinotecano e di SN-38, con conseguente minore eliminazione del metabolita attivo che può quindi rimanere in circolo più a lungo e favorire una prolungata esposizione del tessuto tumorale agli effetti tossici di SN-38. Questo quadro, che spiega l'impatto positivo del polimorfismo -11187G>A sull'efficacia della terapia riscontrato in questa tesi, è in accordo anche con i risultati preliminari ottenuti da due recenti studi condotti su pazienti asiatici con carcinoma polmonare, che hanno evidenziato una potenziale correlazione tra la variante genica ed un aumento dell'AUC di SN-38 e di neutropenia severa a seguito di terapia con irinotecano [131, 223].

Infine l'ultimo trasportatore considerato nell'analisi farmacogenetica di questa tesi è MDR1, codificato dal gene ABCB1, un carrier di efflusso espresso a livello apicale in diversi tessuti normali, quali ad esempio il tratto gastrointestinale, il fegato e i reni, così come nel tessuto tumorale, in maniera innata o acquisita, dove assume un ruolo fondamentale nel determinare fenomeni di resistenza al trattamento. Diversi dati sperimentali hanno evidenziato un coinvolgimento di tale proteina nel trasporto di CPT-11 e, con minore affinità, di SN-38 [66, 68, 150, 151, 152, 153] assumendo quindi un ruolo importante nell'eliminazione biliare ed urinaria di tali substrati. L'analisi univariata di questa tesi ha evidenziato un coinvolgimento fondamentale di MDR1 nel predire la sopravvivenza del paziente, mentre non si sono rilevate correlazioni significative con gli altri aspetti clinici considerati. In particolare, sette marker genici hanno dimostrato un ruolo più o meno importante nel modulare il rischio di morte del paziente: i singoli polimorfismi 2677G>T/A ($p=0.01$), 3435C>T ($p=0.09$), IVS4-25G>T ($p=0.03$), IVS13+24C>T ($p=0.08$) e IVS14+38A>G ($p=0.08$) e gli aplotipi I ($p=0.06$) e II ($p=0.03$) costituiti rispettivamente dallo stato wild-type e variante per tutti e tre i siti polimorfici descritti dall'aplotipo (1236C>T, 3435C>T e 2677G>T/A). Le varianti IVS4-25G>T, IVS13+24C>T e IVS14+38A>G cadono in zone introniche del gene e ad oggi non esistono dati funzionali riguardo un eventuale impatto sul fenotipo della proteina; ad ogni modo dati di letteratura suggeriscono un loro possibile coinvolgimento nel modulare diversi parametri farmacocinetici di terapia con irinotecano [114]. Le due variazioni silenti 3435C>T

e 1236C>T e la sostituzione missense 2677G>T/A, fra loro in elevato grado di LD [175, 176], sono sicuramente i polimorfismi di MDR1 fin'ora più studiati sia *in vitro* che *in vivo*. Nonostante la presenza di un numero veramente considerevole di dati che dimostrano l'impatto di queste varianti, e soprattutto di 3435C>T e 2677G>T/A, sia sui livelli di espressione e funzionalità della proteina che sull'efficienza di trasporto di vari substrati fra cui anche diversi chemioterapici, l'esatto significato funzionale e clinico rimane ad oggi ancora da definire in maniera univoca a causa dell'eterogeneità e a volte discrepanza del pool di risultati ottenuti in questi anni [138, 149, 171, 173, 175, 176, 177, 178]. Per le tre varianti genetiche è stato inoltre ampiamente dimostrato un coinvolgimento nel modulare aspetti farmacocinetici e clinici di terapia con irinotecano sia in singolo [86, 89, 106, 124, 131, 180, 181, 182, 184] che in combinazione aplotipica [180, 181, 182, 189].

Il risultato ottenuto dal lavoro di questa tesi suggerisce globalmente una correlazione tra la forma polimorfica di queste tre varianti ed una maggiore sopravvivenza del paziente e può essere riassunto dall'effetto significativo osservato per l'aplotipo II, costituito dalla combinazione delle forme polimorfiche di tutti e tre i marker genici: la presenza di almeno un allele recante l'aplotipo II, rispetto a non averne alcuna copia, predispone ad un minor rischio di morte con una mediana di sopravvivenza rispettivamente di 24.4 e 19.3 mesi (HR=0.69 95%CI: 0.48-0.97, p=0.03). Questo dato è in disaccordo con quello pubblicato recentemente da Glimelius et al. [182] che assegna al medesimo aplotipo una peggiore sopravvivenza e risposta tumorale; gli autori non forniscono comunque alcuna spiegazione biologica e funzionale a supporto del loro risultato. Il dato osservato in questa tesi è invece in accordo con alcuni dati di letteratura che dimostrano una correlazione tra l'aplotipo II ed una minor clearance renale di CPT-11 e dei suoi metaboliti [189] ed un aumento della tossicità precoce [182]. Non essendo noto ad oggi l'esatto impatto funzionale né delle singole varianti genetiche né della loro combinazione aplotipica, si può soltanto formulare un'ipotesi e supporre che l'attività del trasportatore polimorfico sia alterata in maniera negativa riducendo di conseguenza l'eliminazione biliare e renale del farmaco e favorendo così un'esposizione prolungata al metabolita attivo che si ripercuote in un miglioramento dell'efficacia della terapia. Bisogna inoltre sottolineare che per MDR1 è stato anche suggerito un ruolo nel modulare il processo di carcinogenesi e la biologia del tumore stesso svolgendo quindi un ruolo prognostico che può andare a sommarsi all'impatto diretto esercitato sull'efficacia della terapia [140, 145, 149, 249].

Lo sviluppo di modelli multivariati per l'associazione delle varianti genetiche con la sopravvivenza non ha tuttavia confermato il ruolo significativo, evidenziato dall'analisi

univariata, dei polimorfismi genici di MDR1. L'unico fattore (non genetico) predittivo del grado di sopravvivenza è risultato essere la radicalità dell'intervento chirurgico sul tumore primario. I pazienti che sono stati sottoposti a chirurgia radicale mostrano una mediana di sopravvivenza significativamente ($p < 0.0001$) maggiore rispetto a quelli che non hanno subito l'intervento (25.2 vs 14.0 mesi, HR:0.43 95%CI 0.29-0.63). Ciò è in accordo anche con i dati di letteratura [250].

Il lavoro di questa tesi ha dimostrato inoltre il valore predittivo di altri fattori clinico-demografici quali il sesso del paziente, la localizzazione del tumore primario e il numero di siti metastatici. In particolare, i pazienti di sesso maschile, rispetto alle donne, sono risultati essere significativamente protetti verso lo sviluppo di tossicità sia ematologica che non ematologica durante l'intero corso del trattamento; tale risultato è in accordo con quello evidenziato in un recente studio dove un maggior rischio di neutropenia è stato associato al sesso femminile [106]. E' probabile che i pazienti maschi e femmine differiscano nel comportamento farmacocinetico del farmaco esibendo fra le altre un diverso indice di massa corporea e un diverso grado di perfusione degli organi. Un altro aspetto importante nel modulare l'esito del trattamento con irinotecano è la localizzazione del tumore primario. I pazienti che presentano come sito tumorale primario il colon destro hanno mostrato un rischio 1.4 volte maggiore di andare incontro a progressione di malattia rispetto a quelli con localizzazione al colon sinistro. Ciò può essere spiegato dalla differenza nella forma e nella natura del tumore che è stata dimostrata per le neoplasie originarie dal colon sinistro oppure destro. In particolare, sono state individuate dissomiglianze sia di tipo istologico che di tipo molecolare nello sviluppo della malattia che suggeriscono un diverso meccanismo di carcinogenesi nei due tipi di colon con conseguente differenza nelle caratteristiche biologiche del tumore derivato; nello specifico, il carcinoma del colon destro sembra essere localmente più avanzato e quindi probabilmente più aggressivo rispetto a quello del colon sinistro e ciò è in accordo con i risultati ottenuti in questa tesi [251, 252]. Infine, nel predire la risposta al trattamento, è stato evidenziato un ruolo importante anche per il numero di siti metastatici; Riguardo il ruolo predittivo dei markers genici dei citocromi, il lavoro di questa tesi ha indicato, soprattutto per la variante CYP3A4*1B, un effetto, più o meno significativo, nel modulare alcuni parametri farmacocinetici che tuttavia non si riflette in un impatto farmacodinamico clinicamente rilevante.

Nel regime FOLFIRI, assieme all'irinotecano, viene somministrato anche il 5-FU; per escludere la possibilità di un coinvolgimento, nell'influenzare l'esito clinico osservato, anche di markers genici predittivi dell'effetto farmacologico della fluoropirimidina, si sono studiate

alcune varianti genetiche delle principali proteine implicate nel metabolismo del 5-FU. In particolare si è investigato il ruolo predittivo delle due variazioni missense, 677C>T (Ala222Val) e 1298A>C (Glu429Ala), della 5,10-metilentetraidrofolato reduttasi (MTHFR), tre varianti genetiche, TSER (2R/3R), 3RC>G e TSUR (del6bp1491), della timidilato sintetasi (TS) ed una alterazione nucleotidica intronica IVS14+1G>A per la diidropirimidina deidrogenasi (DPD). L'analisi statistica dei dati non ha rilevato nessuna correlazione genotipi/fenotipo significativa (dati non mostrati) escludendo quindi un ruolo di questi polimorfismi del modulare l'outcome del regime FOLFIRI.

Lo studio di farmacogenetica di questa tesi presenta alcuni limiti. Si tratta innanzitutto di un'analisi retrospettiva i cui risultati richiedono quindi una conferma in altri studi indipendenti prospettici effettuati su larga scala in modo da raggiungere il potere statistico necessario per affrontare un'analisi aplo-tipica. Inoltre il disegno dello studio non ha previsto l'utilizzo di un gruppo di controllo di pazienti non trattati con irinotecano, per cui non è possibile definire in modo conclusivo il valore prognostico o predittivo dei markers genici risultati influenzare dell'efficacia del trattamento. Infine, per favorire una corretta interpretazione biologica delle correlazioni genotipo/fenotipo osservate in questa tesi, risulterà di fondamentale importanza la definizione dell'impatto funzionale delle varianti genetiche analizzate.

In conclusione lo studio della farmacogenetica dell'irinotecano, nel quale si è inserito questo lavoro di tesi, ha permesso di individuare nuovi marcatori biomolecolari dell'outcome clinico della terapia effettuata con regime FOLFIRI. L'analisi svolta ha identificato un set significativo di markers genici ed aplo-tipici riguardanti in particolare il processo di glucuronazione ed il trasporto intra-extracellulare che, assieme ad alcune caratteristiche clinico-demografiche, possono predire l'esito di specifici aspetti del trattamento. Si sono sviluppati, in particolare, dei modelli significativi predittivi in maniera specifica la tossicità ematologica e non ematologica, sia nella sua forma acuta che cumulativa, e l'efficacia del trattamento in termini di risposta tumorale, tempo alla progressione di malattia e sopravvivenza; per ognuno di questi aspetti clinici si è evidenziato uno specifico pool di determinanti genetici in accordo con i diversi meccanismi biologici e biochimici alla base delle diverse forme di tossicità così come della risposta tumorale. In particolare, è emerso un ruolo primario di alcuni trasportatori di membrana, nel determinare sia la tossicità che l'efficacia della terapia, non precedentemente riportato in letteratura. Inoltre, è stato confermato il valore predittivo di polimorfismi genici nelle proteine legate alla reazione di glucuronazione nel definire sia il rischio di sviluppare effetti tossici ematologici (UGT1A7*3,

UGT1A9*22, UGT1A aplotipo I) che l'efficacia della terapia (UGT1A1*28, UGT1A aplotipo II) [240]. In particolar modo il polimorfismo UGT1A1*28 ha mantenuto il suo ruolo preponderante in termini di risposta alla terapia e in particolare nel determinare il tempo alla progressione dei pazienti [115, 241]. Un notevole supporto ai risultati ottenuti è derivato dall'analisi farmacocinetica che ha permesso di ottenere dei dati preliminari importanti per interpretare le associazioni cliniche osservate. Il lavoro di questa tesi, grazie all'elevata numerosità del campione d'indagine, ha permesso, inoltre, di valutare e confermare la validità dell'approccio aplotipico, rispetto allo studio di singole varianti genetiche, nel predire l'esito di terapia con irinotecano. Tale tipo di analisi si è dimostrato in grado di descrivere in maniera efficace l'effetto simultaneo e combinatoriale di più siti polimorfici permettendo così una visione più globale e completa.

I risultati preliminari ottenuti in questa tesi, una volta convalidati da ulteriori studi, potranno divenire per i clinici un valido strumento per ottimizzare e personalizzare la terapia di pazienti con carcinoma colonrettale metastatico trattati con irinotecano in regime FOLFIRI.

BIBLIOGRAFIA

1. Coate L, Cuffe S, Horgan A et al. Germline genetic variation, cancer outcome, and pharmacogenetics. *J Clin Oncol* (2010) 28:4029-4037.
2. Crettol S, Petrovic N and Murray M. Pharmacogenetics of phase I and phase II drug metabolism. *Curr.Pharm.Des* (2010) 16:204-219.
3. Daly AK. Pharmacogenetics and human genetic polymorphisms. *Biochem.J* (2010) 429:435-449.
4. Efferth T, Volm M. Pharmacogenetics for individualized cancer chemotherapy. *Pharmacol.Ther.* (2005) 107:155-176.
5. Ekhart C, Rodenhuis S, Smits PH et al. An overview of the relations between polymorphisms in drug metabolising enzymes and drug transporters and survival after cancer drug treatment. *Cancer Treat.Rev.* (2009) 35:18-31.
6. Shin J, Kayser SR and Langaee TY. Pharmacogenetics: from discovery to patient care. *Am.J Health Syst.Pharm.* (2009) 66:625-637.
7. Huang RS, Ratain MJ. Pharmacogenetics and pharmacogenomics of anticancer agents. *CA Cancer J Clin* (2009) 59:42-55.
8. Imyanitov EN, Moiseyenko VM. Molecular-based choice of cancer therapy: realities and expectations. *Clin Chim.Acta* (2007) 379:1-13.
9. Marsh S, McLeod HL. Pharmacogenomics: from bedside to clinical practice. *Hum.Mol.Genet.* (2006) 15 Spec No 1:R89-R93.
10. Hoskins JM, Goldberg RM, Qu P et al. UGT1A1*28 genotype and irinotecan-induced neutropenia: dose matters. *J Natl.Cancer Inst.* (2007) 99:1290-1295.
11. O'Donnell PH, Dolan ME. Cancer pharmacoethnicity: ethnic differences in susceptibility to the effects of chemotherapy. *Clin Cancer Res.* (2009) 15:4806-4814.
12. Kunitomo T, Nitta K, Tanaka T et al. Antitumor activity of 7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino]carbonyloxy-camptothecin, a novel water-soluble derivative of camptothecin, against murine tumors. *Cancer Res.* (1987) 47:5944-5947.
13. Oberlies NH, Kroll DJ. Camptothecin and taxol: historic achievements in natural products research. *J Nat.Prod.* (2004) 67:129-135.
14. Crow RT, Crothers DM. Structural modifications of camptothecin and effects on topoisomerase I inhibition. *J Med.Chem.* (1992) 35:4160-4164.
15. Hertzberg RP, Caranfa MJ and Hecht SM. On the mechanism of topoisomerase I inhibition by camptothecin: evidence for binding to an enzyme-DNA complex. *Biochemistry* (1989) 28:4629-4638.
16. Hertzberg RP, Caranfa MJ, Holden KG et al. Modification of the hydroxy lactone ring of camptothecin: inhibition of mammalian topoisomerase I and biological activity. *J Med.Chem.* (1989) 32:715-720.
17. Burke TG, Mi Z. Preferential binding of the carboxylate form of camptothecin by human serum albumin. *Anal.Biochem.* (1993) 212:285-287.
18. Fassberg J, Stella VJ. A kinetic and mechanistic study of the hydrolysis of camptothecin and some analogues. *J Pharm.Sci.* (1992) 81:676-684.

19. Burke TG, Mi Z. The structural basis of camptothecin interactions with human serum albumin: impact on drug stability. *J Med.Chem.* (1994) 37:40-46.
20. Moertel CG, Schutt AJ, Reitemeier RJ et al. Phase II study of camptothecin (NSC-100880) in the treatment of advanced gastrointestinal cancer. *Cancer Chemother.Rep.* (1972) 56:95-101.
21. Schaeppi U, Fleischman RW and Cooney DA. Toxicity of camptothecin (NSC-100880). *Cancer Chemother.Rep.3* (1974) 5:25-36.
22. Hsiang YH, Hertzberg R, Hecht S et al. Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *J Biol.Chem.* (1985) 260:14873-14878.
23. Hsiang YH, Lihou MG and Liu LF. Arrest of replication forks by drug-stabilized topoisomerase I-DNA cleavable complexes as a mechanism of cell killing by camptothecin. *Cancer Res.* (1989) 49:5077-5082.
24. Sawada S, Okajima S, Aiyama R et al. Synthesis and antitumor activity of 20(S)-camptothecin derivatives: carbamate-linked, water-soluble derivatives of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin. *Chem.Pharm.Bull.(Tokyo)* (1991) 39:1446-1450.
25. Wani MC, Nicholas AW, Manikumar G et al. Plant antitumor agents. 25. Total synthesis and antileukemic activity of ring A substituted camptothecin analogues. Structure-activity correlations. *J Med.Chem.* (1987) 30:1774-1779.
26. Burke TG, Mi Z. Ethyl substitution at the 7 position extends the half-life of 10-hydroxycamptothecin in the presence of human serum albumin. *J Med.Chem.* (1993) 36:2580-2582.
27. Slichenmyer WJ, Rowinsky EK, Grochow LB et al. Camptothecin analogues: studies from the Johns Hopkins Oncology Center. *Cancer Chemother.Pharmacol.* (1994) 34 Suppl:S53-S57.
28. Tanizawa A, Fujimori A, Fujimori Y et al. Comparison of topoisomerase I inhibition, DNA damage, and cytotoxicity of camptothecin derivatives presently in clinical trials. *J Natl.Cancer Inst.* (1994) 86:836-842.
29. Kingsbury WD, Boehm JC, Jakas DR et al. Synthesis of water-soluble (aminoalkyl)camptothecin analogues: inhibition of topoisomerase I and antitumor activity. *J Med.Chem.* (1991) 34:98-107.
30. Rowinsky EK, Grochow LB, Hendricks CB et al. Phase I and pharmacologic study of topotecan: a novel topoisomerase I inhibitor. *J Clin Oncol* (1992) 10:647-656.
31. Kawato Y, Furuta T, Aonuma M et al. Antitumor activity of a camptothecin derivative, CPT-11, against human tumor xenografts in nude mice. *Cancer Chemother.Pharmacol.* (1991) 28:192-198.
32. Kawato Y, Aonuma M, Hirota Y et al. Intracellular roles of SN-38, a metabolite of the camptothecin derivative CPT-11, in the antitumor effect of CPT-11. *Cancer Res.* (1991) 51:4187-4191.
33. Rothenberg ML. Topoisomerase I inhibitors: review and update. *Ann.Oncol* (1997) 8:837-855.
34. Wang JC. DNA topoisomerases. *Annu.Rev.Biochem.* (1996) 65:635-692.
35. Stewart L, Redinbo MR, Qiu X et al. A model for the mechanism of human topoisomerase I. *Science* (1998) 279:1534-1541.
36. Thompson J, Zamboni WC, Cheshire PJ et al. Efficacy of systemic administration of irinotecan against neuroblastoma xenografts. *Clin Cancer Res.* (1997) 3:423-431.
37. Mathijssen RH, van Alphen RJ, Verweij J et al. Clinical pharmacokinetics and metabolism of irinotecan (CPT-11). *Clin Cancer Res.* (2001) 7:2182-2194.
38. Robert J, Rivory L. Pharmacology of irinotecan. *Drugs Today (Barc.)* (1998) 34:777-803.

39. Khanna R, Morton CL, Danks MK et al. Proficient metabolism of irinotecan by a human intestinal carboxylesterase. *Cancer Res.* (2000) 60:4725-4728.
40. Rivory LP, Bowles MR, Robert J et al. Conversion of irinotecan (CPT-11) to its active metabolite, 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38), by human liver carboxylesterase. *Biochem.Pharmacol.* (1996) 52:1103-1111.
41. Slatter JG, Su P, Sams JP et al. Bioactivation of the anticancer agent CPT-11 to SN-38 by human hepatic microsomal carboxylesterases and the in vitro assessment of potential drug interactions. *Drug Metab Dispos.* (1997) 25:1157-1164.
42. Humerickhouse R, Lohrbach K, Li L et al. Characterization of CPT-11 hydrolysis by human liver carboxylesterase isoforms hCE-1 and hCE-2. *Cancer Res.* (2000) 60:1189-1192.
43. Senter PD, Beam KS, Mixan B et al. Identification and activities of human carboxylesterases for the activation of CPT-11, a clinically approved anticancer drug. *Bioconjug.Chem.* (2001) 12:1074-1080.
44. Stoops JK, Horgan DJ, Runnegar MT et al. Carboxylesterases (EC 3.1.1). Kinetic studies on carboxylesterases. *Biochemistry* (1969) 8:2026-2033.
45. Rivory LP, Chatelut E, Canal P et al. Kinetics of the in vivo interconversion of the carboxylate and lactone forms of irinotecan (CPT-11) and of its metabolite SN-38 in patients. *Cancer Res.* (1994) 54:6330-6333.
46. Tanizawa A, Kohn KW, Kohlhagen G et al. Differential stabilization of eukaryotic DNA topoisomerase I cleavable complexes by camptothecin derivatives. *Biochemistry* (1995) 34:7200-7206.
47. Gerrits CJ, de Jonge MJ, Schellens JH et al. Topoisomerase I inhibitors: the relevance of prolonged exposure for present clinical development. *Br.J Cancer* (1997) 76:952-962.
48. Santos A, Zanetta S, Cresteil T et al. Metabolism of irinotecan (CPT-11) by CYP3A4 and CYP3A5 in humans. *Clin Cancer Res.* (2000) 6:2012-2020.
49. Dodds HM, Haaz MC, Riou JF et al. Identification of a new metabolite of CPT-11 (irinotecan): pharmacological properties and activation to SN-38. *J Pharmacol.Exp.Ther.* (1998) 286:578-583.
50. Haaz MC, Riche C, Rivory LP et al. Biosynthesis of an aminopiperidino metabolite of irinotecan [7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino]carbonyloxycamptothecine] by human hepatic microsomes. *Drug Metab Dispos.* (1998) 26:769-774.
51. Lokiec F, du Sorbier BM and Sanderink GJ. Irinotecan (CPT-11) metabolites in human bile and urine. *Clin Cancer Res.* (1996) 2:1943-1949.
52. Ciotti M, Basu N, Brangi M et al. Glucuronidation of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38) by the human UDP-glucuronosyltransferases encoded at the UGT1 locus. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* (1999) 260:199-202.
53. Gagne JF, Montminy V, Belanger P et al. Common human UGT1A polymorphisms and the altered metabolism of irinotecan active metabolite 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38). *Mol.Pharmacol.* (2002) 62:608-617.
54. Hanioka N, Ozawa S, Jinno H et al. Human liver UDP-glucuronosyltransferase isoforms involved in the glucuronidation of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin. *Xenobiotica* (2001) 31:687-699.
55. Iyer L, King CD, Whittington PF et al. Genetic predisposition to the metabolism of irinotecan (CPT-11). Role of uridine diphosphate glucuronosyltransferase isoform 1A1 in the glucuronidation of its active metabolite (SN-38) in human liver microsomes. *J Clin Invest* (1998) 101:847-854.

56. Gupta E, Lestingi TM, Mick R et al. Metabolic fate of irinotecan in humans: correlation of glucuronidation with diarrhea. *Cancer Res.* (1994) 54:3723-3725.
57. Mallett AK, Bearne CA and Rowland IR. The influence of incubation pH on the activity of rat and human gut flora enzymes. *J Appl. Bacteriol.* (1989) 66:433-437.
58. Takasuna K, Hagiwara T, Hirohashi M et al. Involvement of beta-glucuronidase in intestinal microflora in the intestinal toxicity of the antitumor camptothecin derivative irinotecan hydrochloride (CPT-11) in rats. *Cancer Res.* (1996) 56:3752-3757.
59. Fujiwara Y, Minami H. An overview of the recent progress in irinotecan pharmacogenetics. *Pharmacogenomics.* (2010) 11:391-406.
60. Kobayashi K, Bouscarel B, Matsuzaki Y et al. pH-dependent uptake of irinotecan and its active metabolite, SN-38, by intestinal cells. *Int. J Cancer* (1999) 83:491-496.
61. Slatter JG, Schaaf LJ, Sams JP et al. Pharmacokinetics, metabolism, and excretion of irinotecan (CPT-11) following I.V. infusion of [(14)C]CPT-11 in cancer patients. *Drug Metab Dispos.* (2000) 28:423-433.
62. Rothenberg ML. Irinotecan (CPT-11): recent developments and future directions--colorectal cancer and beyond. *Oncologist.* (2001) 6:66-80.
63. De Dosso S, Sessa C and Saletti P. Adjuvant therapy for colon cancer: present and perspectives. *Cancer Treat. Rev.* (2009) 35:160-166.
64. Yonemori K, Takeda Y, Toyota E et al. Potential interactions between irinotecan and rifampin in a patient with small-cell lung cancer. *Int. J Clin Oncol* (2004) 9:206-209.
65. Gupta E, Wang X, Ramirez J et al. Modulation of glucuronidation of SN-38, the active metabolite of irinotecan, by valproic acid and phenobarbital. *Cancer Chemother. Pharmacol.* (1997) 39:440-444.
66. Chu XY, Kato Y and Sugiyama Y. Possible involvement of P-glycoprotein in biliary excretion of CPT-11 in rats. *Drug Metab Dispos.* (1999) 27:440-441.
67. Gupta E, Safa AR, Wang X et al. Pharmacokinetic modulation of irinotecan and metabolites by cyclosporin A. *Cancer Res.* (1996) 56:1309-1314.
68. Sugiyama Y, Kato Y and Chu X. Multiplicity of biliary excretion mechanisms for the camptothecin derivative irinotecan (CPT-11), its metabolite SN-38, and its glucuronide: role of canalicular multispecific organic anion transporter and P-glycoprotein. *Cancer Chemother. Pharmacol.* (1998) 42 Suppl:S44-S49.
69. Bleiberg H, Cvitkovic E. Characterisation and clinical management of CPT-11 (irinotecan)-induced adverse events: the European perspective. *Eur. J Cancer* (1996) 32A Suppl 3:S18-S23.
70. Rougier P, Bugat R. CPT-11 in the treatment of colorectal cancer: clinical efficacy and safety profile. *Semin. Oncol* (1996) 23:34-41.
71. Pitot HC, Wender DB, O'Connell MJ et al. Phase II trial of irinotecan in patients with metastatic colorectal carcinoma. *J Clin Oncol* (1997) 15:2910-2919.
72. Horikawa M, Kato Y, Tyson CA et al. The potential for an interaction between MRP2 (ABCC2) and various therapeutic agents: probenecid as a candidate inhibitor of the biliary excretion of irinotecan metabolites. *Drug Metab Pharmacokinet.* (2002) 17:23-33.
73. Kehrer DF, Yamamoto W, Verweij J et al. Factors involved in prolongation of the terminal disposition phase of SN-38: clinical and experimental studies. *Clin Cancer Res.* (2000) 6:3451-3458.

74. Planting A. Modulation of Irinotecan Pharmacokinetics/Pharmacodynamics by Combined Treatment with Neomycin. *2000 ASCO Annual Meeting n° 1007*.
75. Takasuna K, Hagiwara T, Hirohashi M et al. Inhibition of intestinal microflora beta-glucuronidase modifies the distribution of the active metabolite of the antitumor agent, irinotecan hydrochloride (CPT-11) in rats. *Cancer Chemother.Pharmacol.* **(1998)** 42:280-286.
76. Fujita K, Sparreboom A. Pharmacogenetics of irinotecan disposition and toxicity: a review. *Curr.Clin Pharmacol.* **(2010)** 5:209-217.
77. Marsh S, Hoskins JM. Irinotecan pharmacogenomics. *Pharmacogenomics.* **(2010)** 11:1003-1010.
78. O'Neil BH, Goldberg RM. Innovations in chemotherapy for metastatic colorectal cancer: an update of recent clinical trials. *Oncologist.* **(2008)** 13:1074-1083.
79. Wolpin BM, Mayer RJ. Systemic treatment of colorectal cancer. *Gastroenterology* **(2008)** 134:1296-1310.
80. Saltz LB, Cox JV, Blanke C et al. Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. Irinotecan Study Group. *N.Engl.J Med.* **(2000)** 343:905-914.
81. Douillard JY, Cunningham D, Roth AD et al. Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. *Lancet* **(2000)** 355:1041-1047.
82. de Gramont A, Bosset JF, Milan C et al. Randomized trial comparing monthly low-dose leucovorin and fluorouracil bolus with bimonthly high-dose leucovorin and fluorouracil bolus plus continuous infusion for advanced colorectal cancer: a French intergroup study. *J Clin Oncol* **(1997)** 15:808-815.
83. Arnold D, Seufferlein T. Targeted treatments in colorectal cancer: state of the art and future perspectives. *Gut* **(2010)** 59:838-858.
84. Eng C. The evolving role of monoclonal antibodies in colorectal cancer: early presumptions and impact on clinical trial development. *Oncologist.* **(2010)** 15:73-84.
85. Cecchin E, Corona G, Masier S et al. Carboxylesterase isoform 2 mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells is a predictive marker of the irinotecan to SN38 activation step in colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res.* **(2005)** 11:6901-6907.
86. Mathijssen RH, Marsh S, Karlsson MO et al. Irinotecan pathway genotype analysis to predict pharmacokinetics. *Clin Cancer Res.* **(2003)** 9:3246-3253.
87. Morishita Y, Fujii M, Kasakura Y et al. Effect of carboxylesterase inhibition on the anti-tumour effects of irinotecan. *J Int.Med.Res.* **(2005)** 33:84-89.
88. Rouits E, Charasson V, Petain A et al. Pharmacokinetic and pharmacogenetic determinants of the activity and toxicity of irinotecan in metastatic colorectal cancer patients. *Br.J Cancer* **(2008)** 99:1239-1245.
89. Sai K, Saito Y, Tatewaki N et al. Association of carboxylesterase 1A genotypes with irinotecan pharmacokinetics in Japanese cancer patients. *Br.J Clin Pharmacol.* **(2010)** 70:222-233.
90. Braun MS, Richman SD, Quirke P et al. Predictive biomarkers of chemotherapy efficacy in colorectal cancer: results from the UK MRC FOCUS trial. *J Clin Oncol* **(2008)** 26:2690-2698.
91. Hoskins JM, Marcuello E, Altes A et al. Irinotecan pharmacogenetics: influence of pharmacodynamic genes. *Clin Cancer Res.* **(2008)** 14:1788-1796.
92. Jansen WJ, Zwart B, Hulscher ST et al. CPT-11 in human colon-cancer cell lines and xenografts: characterization of cellular sensitivity determinants. *Int.J Cancer* **(1997)** 70:335-340.

93. Auman JT, McLeod HL. Applications of genomic tools to colorectal cancer therapeutics. *Curr.Opin.Mol.Ther.* (2008) 10:548-554.
94. Kweekel D, Guchelaar HJ and Gelderblom H. Clinical and pharmacogenetic factors associated with irinotecan toxicity. *Cancer Treat.Rev.* (2008) 34:656-669.
95. Strimpakos AS, Syrigos KN and Saif MW. Pharmacogenetics and biomarkers in colorectal cancer. *Pharmacogenomics.J* (2009) 9:147-160.
96. Bozina N, Bradamante V and Lovric M. Genetic polymorphism of metabolic enzymes P450 (CYP) as a susceptibility factor for drug response, toxicity, and cancer risk. *Arh.Hig.Rada Toksikol.* (2009) 60:217-242.
97. Mathijssen RH, de Jong FA, van Schaik RH et al. Prediction of irinotecan pharmacokinetics by use of cytochrome P450 3A4 phenotyping probes. *J Natl.Cancer Inst.* (2004) 96:1585-1592.
98. van der Bol JM, Mathijssen RH, Creemers GJ et al. A CYP3A4 phenotype-based dosing algorithm for individualized treatment of irinotecan. *Clin Cancer Res.* (2010) 16:736-742.
99. McLeod HL, Sargent DJ, Marsh S et al. Pharmacogenetic predictors of adverse events and response to chemotherapy in metastatic colorectal cancer: results from North American Gastrointestinal Intergroup Trial N9741. *J Clin Oncol* (2010) 28:3227-3233.
100. Amirimani B, Ning B, Deitz AC et al. Increased transcriptional activity of the CYP3A4*1B promoter variant. *Environ.Mol.Mutagen.* (2003) 42:299-305.
101. Kuehl P, Zhang J, Lin Y et al. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat.Genet.* (2001) 27:383-391.
102. Nagar S, Rimmel RP. Uridine diphosphoglucuronosyltransferase pharmacogenetics and cancer. *Oncogene* (2006) 25:1659-1672.
103. Strassburg CP, Kalthoff S and Ehmer U. Variability and function of family 1 uridine-5'-diphosphate glucuronosyltransferases (UGT1A). *Crit Rev.Clin Lab Sci.* (2008) 45:485-530.
104. Tukey RH, Strassburg CP. Human UDP-glucuronosyltransferases: metabolism, expression, and disease. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* (2000) 40:581-616.
105. Innocenti F, Undevia SD, Iyer L et al. Genetic variants in the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 gene predict the risk of severe neutropenia of irinotecan. *J Clin Oncol* (2004) 22:1382-1388.
106. Innocenti F, Kroetz DL, Schuetz E et al. Comprehensive pharmacogenetic analysis of irinotecan neutropenia and pharmacokinetics. *J Clin Oncol* (2009) 27:2604-2614.
107. Ramchandani RP, Wang Y, Booth BP et al. The role of SN-38 exposure, UGT1A1*28 polymorphism, and baseline bilirubin level in predicting severe irinotecan toxicity. *J Clin Pharmacol.* (2007) 47:78-86.
108. Carlini LE, Meropol NJ, Bever J et al. UGT1A7 and UGT1A9 polymorphisms predict response and toxicity in colorectal cancer patients treated with capecitabine/irinotecan. *Clin Cancer Res.* (2005) 11:1226-1236.
109. Innocenti F, Liu W, Chen P et al. Haplotypes of variants in the UDP-glucuronosyltransferase 1A9 and 1A1 genes. *Pharmacogenet.Genomics* (2005) 15:295-301.
110. Martinez-Balibrea E, Abad A, Martinez-Cardus A et al. UGT1A and TYMS genetic variants predict toxicity and response of colorectal cancer patients treated with first-line irinotecan and fluorouracil combination therapy. *Br.J Cancer* (2010) 103:581-589.

111. Ando Y, Saka H, Asai G et al. UGT1A1 genotypes and glucuronidation of SN-38, the active metabolite of irinotecan. *Ann.Oncol* (1998) 9:845-847.
112. Bosma PJ, Chowdhury JR, Bakker C et al. The genetic basis of the reduced expression of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 in Gilbert's syndrome. *N.Engl.J Med.* (1995) 333:1171-1175.
113. Iyer L, Hall D, Das S et al. Phenotype-genotype correlation of in vitro SN-38 (active metabolite of irinotecan) and bilirubin glucuronidation in human liver tissue with UGT1A1 promoter polymorphism. *Clin Pharmacol.Ther.* (1999) 65:576-582.
114. Rosner GL, Panetta JC, Innocenti F et al. Pharmacogenetic pathway analysis of irinotecan. *Clin Pharmacol.Ther.* (2008) 84:393-402.
115. Toffoli G, Cecchin E, Corona G et al. The role of UGT1A1*28 polymorphism in the pharmacodynamics and pharmacokinetics of irinotecan in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* (2006) 24:3061-3068.
116. Iyer L, Das S, Janisch L et al. UGT1A1*28 polymorphism as a determinant of irinotecan disposition and toxicity. *Pharmacogenomics.J* (2002) 2:43-47.
117. Minami H, Sai K, Saeki M et al. Irinotecan pharmacokinetics/pharmacodynamics and UGT1A genetic polymorphisms in Japanese: roles of UGT1A1*6 and *28. *Pharmacogenet.Genomics* (2007) 17:497-504.
118. Paoluzzi L, Singh AS, Price DK et al. Influence of genetic variants in UGT1A1 and UGT1A9 on the in vivo glucuronidation of SN-38. *J Clin Pharmacol.* (2004) 44:854-860.
119. Schulz C, Boeck S, Heinemann V et al. UGT1A1 genotyping: a predictor of irinotecan-associated side effects and drug efficacy? *Anticancer Drugs* (2009) 20:867-879.
120. Hu ZY, Yu Q and Zhao YS. Dose-dependent association between UGT1A1*28 polymorphism and irinotecan-induced diarrhoea: a meta-analysis. *Eur.J Cancer* (2010) 46:1856-1865.
121. Hu ZY, Yu Q, Pei Q et al. Dose-dependent association between UGT1A1*28 genotype and irinotecan-induced neutropenia: low doses also increase risk. *Clin Cancer Res.* (2010) 16:3832-3842.
122. Font A, Sanchez JM, Taron M et al. Weekly regimen of irinotecan/docetaxel in previously treated non-small cell lung cancer patients and correlation with uridine diphosphate glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1) polymorphism. *Invest New Drugs* (2003) 21:435-443.
123. Cote JF, Kirzin S, Kramar A et al. UGT1A1 polymorphism can predict hematologic toxicity in patients treated with irinotecan. *Clin Cancer Res.* (2007) 13:3269-3275.
124. Lara PN, Jr., Natale R, Crowley J et al. Phase III trial of irinotecan/cisplatin compared with etoposide/cisplatin in extensive-stage small-cell lung cancer: clinical and pharmacogenomic results from SWOG S0124. *J Clin Oncol* (2009) 27:2530-2535.
125. Kitagawa C, Ando M, Ando Y et al. Genetic polymorphism in the phenobarbital-responsive enhancer module of the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 gene and irinotecan toxicity. *Pharmacogenet.Genomics* (2005) 15:35-41.
126. Sugatani J, Yamakawa K, Yoshinari K et al. Identification of a defect in the UGT1A1 gene promoter and its association with hyperbilirubinemia. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* (2002) 292:492-497.
127. Guillemette C, Ritter JK, Auyeung DJ et al. Structural heterogeneity at the UDP-glucuronosyltransferase 1 locus: functional consequences of three novel missense mutations in the human UGT1A7 gene. *Pharmacogenetics* (2000) 10:629-644.
128. Villeneuve L, Girard H, Fortier LC et al. Novel functional polymorphisms in the UGT1A7 and UGT1A9 glucuronidating enzymes in Caucasian and African-American subjects and their impact on the

- metabolism of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin and flavopiridol anticancer drugs. *J Pharmacol.Exp.Ther.* (2003) 307:117-128.
129. Fujita K, Ando Y, Nagashima F et al. Genetic linkage of UGT1A7 and UGT1A9 polymorphisms to UGT1A1*6 is associated with reduced activity for SN-38 in Japanese patients with cancer. *Cancer Chemother.Pharmacol.* (2007) 60:515-522.
130. Han JY, Lim HS, Shin ES et al. Comprehensive analysis of UGT1A polymorphisms predictive for pharmacokinetics and treatment outcome in patients with non-small-cell lung cancer treated with irinotecan and cisplatin. *J Clin Oncol* (2006) 24:2237-2244.
131. Han JY, Lim HS, Park YH et al. Integrated pharmacogenetic prediction of irinotecan pharmacokinetics and toxicity in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* (2009) 63:115-120.
132. Lankisch TO, Schulz C, Zwingers T et al. Gilbert's Syndrome and irinotecan toxicity: combination with UDP-glucuronosyltransferase 1A7 variants increases risk. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* (2008) 17:695-701.
133. Yamanaka H, Nakajima M, Katoh M et al. A novel polymorphism in the promoter region of human UGT1A9 gene (UGT1A9*22) and its effects on the transcriptional activity. *Pharmacogenetics* (2004) 14:329-332.
134. Girard H, Court MH, Bernard O et al. Identification of common polymorphisms in the promoter of the UGT1A9 gene: evidence that UGT1A9 protein and activity levels are strongly genetically controlled in the liver. *Pharmacogenetics* (2004) 14:501-515.
135. Ramirez J, Liu W, Mirkov S et al. Lack of association between common polymorphisms in UGT1A9 and gene expression and activity. *Drug Metab Dispos.* (2007) 35:2149-2153.
136. Innocenti F, Grimsley C, Das S et al. Haplotype structure of the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 promoter in different ethnic groups. *Pharmacogenetics* (2002) 12:725-733.
137. Ho RH, Kim RB. Transporters and drug therapy: implications for drug disposition and disease. *Clin Pharmacol.Ther.* (2005) 78:260-277.
138. Kerb R. Implications of genetic polymorphisms in drug transporters for pharmacotherapy. *Cancer Lett.* (2006) 234:4-33.
139. Ito K, Suzuki H, Horie T et al. Apical/basolateral surface expression of drug transporters and its role in vectorial drug transport. *Pharm.Res.* (2005) 22:1559-1577.
140. Choudhuri S, Klaassen CD. Structure, function, expression, genomic organization, and single nucleotide polymorphisms of human ABCB1 (MDR1), ABCC (MRP), and ABCG2 (BCRP) efflux transporters. *Int.J Toxicol.* (2006) 25:231-259.
141. Bansal T, Awasthi A, Jaggi M et al. Pre-clinical evidence for altered absorption and biliary excretion of irinotecan (CPT-11) in combination with quercetin: possible contribution of P-glycoprotein. *Life Sci.* (2008) 83:250-259.
142. Itoh T, Itagaki S, Sumi Y et al. Uptake of irinotecan metabolite SN-38 by the human intestinal cell line Caco-2. *Cancer Chemother.Pharmacol.* (2005) 55:420-424.
143. Kruijtzter CM, Beijnen JH and Schellens JH. Improvement of oral drug treatment by temporary inhibition of drug transporters and/or cytochrome P450 in the gastrointestinal tract and liver: an overview. *Oncologist.* (2002) 7:516-530.
144. Niemi M. Role of OATP transporters in the disposition of drugs. *Pharmacogenomics.* (2007) 8:787-802.

145. Ross DD, Nakanishi T. Impact of breast cancer resistance protein on cancer treatment outcomes. *Methods Mol.Biol.* (2010) 596:251-290.
146. Staud F, Ceckova M, Micuda S et al. Expression and function of p-glycoprotein in normal tissues: effect on pharmacokinetics. *Methods Mol.Biol.* (2010) 596:199-222.
147. Zhou SF. Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition. *Xenobiotica* (2008) 38:802-832.
148. Lockhart AC, Tirona RG and Kim RB. Pharmacogenetics of ATP-binding cassette transporters in cancer and chemotherapy. *Mol.Cancer Ther.* (2003) 2:685-698.
149. Cascorbi I, Haenisch S. Pharmacogenetics of ATP-binding cassette transporters and clinical implications. *Methods Mol.Biol.* (2010) 596:95-121.
150. Arimori K, Kuroki N, Hidaka M et al. Effect of P-glycoprotein modulator, cyclosporin A, on the gastrointestinal excretion of irinotecan and its metabolite SN-38 in rats. *Pharm.Res.* (2003) 20:910-917.
151. Chu XY, Suzuki H, Ueda K et al. Active efflux of CPT-11 and its metabolites in human KB-derived cell lines. *J Pharmacol.Exp.Ther.* (1999) 288:735-741.
152. Iyer L, Ramirez J, Shepard DR et al. Biliary transport of irinotecan and metabolites in normal and P-glycoprotein-deficient mice. *Cancer Chemother.Pharmacol.* (2002) 49:336-341.
153. Luo FR, Paranjpe PV, Guo A et al. Intestinal transport of irinotecan in Caco-2 cells and MDCK II cells overexpressing efflux transporters Pgp, cMOAT, and MRP1. *Drug Metab Dispos.* (2002) 30:763-770.
154. Kruh GD, Belinsky MG. The MRP family of drug efflux pumps. *Oncogene* (2003) 22:7537-7552.
155. Chen ZS, Furukawa T, Sumizawa T et al. ATP-Dependent efflux of CPT-11 and SN-38 by the multidrug resistance protein (MRP) and its inhibition by PAK-104P. *Mol.Pharmacol.* (1999) 55:921-928.
156. Fardel O, Jigorel E, Le Vee M et al. Physiological, pharmacological and clinical features of the multidrug resistance protein 2. *Biomed.Pharmacother.* (2005) 59:104-114.
157. Suzuki H, Sugiyama Y. Single nucleotide polymorphisms in multidrug resistance associated protein 2 (MRP2/ABCC2): its impact on drug disposition. *Adv.Drug Deliv.Rev.* (2002) 54:1311-1331.
158. Chu XY, Kato Y, Niinuma K et al. Multispecific organic anion transporter is responsible for the biliary excretion of the camptothecin derivative irinotecan and its metabolites in rats. *J Pharmacol.Exp.Ther.* (1997) 281:304-314.
159. Chu XY, Kato Y and Sugiyama Y. Multiplicity of biliary excretion mechanisms for irinotecan, CPT-11, and its metabolites in rats. *Cancer Res.* (1997) 57:1934-1938.
160. Chu XY, Kato Y, Ueda K et al. Biliary excretion mechanism of CPT-11 and its metabolites in humans: involvement of primary active transporters. *Cancer Res.* (1998) 58:5137-5143.
161. Bessho Y, Oguri T, Achiwa H et al. Role of ABCG2 as a biomarker for predicting resistance to CPT-11/SN-38 in lung cancer. *Cancer Sci.* (2006) 97:192-198.
162. Kawabata S, Oka M, Shiozawa K et al. Breast cancer resistance protein directly confers SN-38 resistance of lung cancer cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* (2001) 280:1216-1223.
163. Kawabata S, Oka M, Soda H et al. Expression and functional analyses of breast cancer resistance protein in lung cancer. *Clin Cancer Res.* (2003) 9:3052-3057.

164. Nakatomi K, Yoshikawa M, Oka M et al. Transport of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38) by breast cancer resistance protein ABCG2 in human lung cancer cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* (2001) 288:827-832.
165. Yoshikawa M, Ikegami Y, Sano K et al. Transport of SN-38 by the wild type of human ABC transporter ABCG2 and its inhibition by quercetin, a natural flavonoid. *J Exp.Ther.Oncol* (2004) 4:25-35.
166. Candeil L, Gourdiere I, Peyron D et al. ABCG2 overexpression in colon cancer cells resistant to SN38 and in irinotecan-treated metastases. *Int.J Cancer* (2004) 109:848-854.
167. Takemoto I, Itagaki S, Chiba M et al. Characterization of secretory intestinal transport of the lactone form of CPT-11. *Cancer Chemother.Pharmacol.* (2006) 57:129-133.
168. Kalliokoski A, Niemi M. Impact of OATP transporters on pharmacokinetics. *Br.J Pharmacol.* (2009) 158:693-705.
169. Nozawa T, Minami H, Sugiura S et al. Role of organic anion transporter OATP1B1 (OATP-C) in hepatic uptake of irinotecan and its active metabolite, 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin: in vitro evidence and effect of single nucleotide polymorphisms. *Drug Metab Dispos.* (2005) 33:434-439.
170. Xiang X, Jada SR, Li HH et al. Pharmacogenetics of SLCO1B1 gene and the impact of *1b and *15 haplotypes on irinotecan disposition in Asian cancer patients. *Pharmacogenet.Genomics* (2006) 16:683-691.
171. Franke RM, Gardner ER and Sparreboom A. Pharmacogenetics of drug transporters. *Curr.Pharm.Des* (2010) 16:220-230.
172. Gradhand U, Kim RB. Pharmacogenomics of MRP transporters (ABCC1-5) and BCRP (ABCG2). *Drug Metab Rev.* (2008) 40:317-354.
173. Fung KL, Gottesman MM. A synonymous polymorphism in a common MDR1 (ABCB1) haplotype shapes protein function. *Biochim.Biophys.Acta* (2009) 1794:860-871.
174. Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW et al. A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science* (2007) 315:525-528.
175. Chinn LW, Kroetz DL. ABCB1 pharmacogenetics: progress, pitfalls, and promise. *Clin Pharmacol.Ther.* (2007) 81:265-269.
176. Haufroid V. Genetic Polymorphisms of ATP-Binding Cassette Transporters ABCB1 and ABCC2 and their Impact on Drug Disposition. *Curr.Drug Targets.* (2010).
177. Gow JM, Hodges LM, Chinn LW et al. Substrate-dependent effects of human ABCB1 coding polymorphisms. *J Pharmacol.Exp.Ther.* (2008) 325:435-442.
178. Lepper ER, Nooter K, Verweij J et al. Mechanisms of resistance to anticancer drugs: the role of the polymorphic ABC transporters ABCB1 and ABCG2. *Pharmacogenomics.* (2005) 6:115-138.
179. Fujita K, Nagashima F, Yamamoto W et al. Association of ATP-binding cassette, sub-family C, number 2 (ABCC2) genotype with pharmacokinetics of irinotecan in Japanese patients with metastatic colorectal cancer treated with irinotecan plus infusional 5-fluorouracil/leucovorin (FOLFIRI). *Biol.Pharm.Bull.* (2008) 31:2137-2142.
180. Han JY, Lim HS, Yoo YK et al. Associations of ABCB1, ABCC2, and ABCG2 polymorphisms with irinotecan-pharmacokinetics and clinical outcome in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Cancer* (2007) 110:138-147.
181. Zhou Q, Sparreboom A, Tan EH et al. Pharmacogenetic profiling across the irinotecan pathway in Asian patients with cancer. *Br.J Clin Pharmacol.* (2005) 59:415-424.

182. Glimelius B, Garmo H, Berglund A et al. Prediction of irinotecan and 5-fluorouracil toxicity and response in patients with advanced colorectal cancer. *Pharmacogenomics.J* (2010).
183. Frittitta L, Ercolino T, Bozzali M et al. A cluster of three single nucleotide polymorphisms in the 3'-untranslated region of human glycoprotein PC-1 gene stabilizes PC-1 mRNA and is associated with increased PC-1 protein content and insulin resistance-related abnormalities. *Diabetes* (2001) 50:1952-1955.
184. Rhodes KE, Zhang W, Yang D et al. ABCB1, SLCO1B1 and UGT1A1 gene polymorphisms are associated with toxicity in metastatic colorectal cancer patients treated with first-line irinotecan. *Drug Metab Lett.* (2007) 1:23-30.
185. Loo TW, Clarke DM. Drug-stimulated ATPase activity of human P-glycoprotein requires movement between transmembrane segments 6 and 12. *J Biol.Chem.* (1997) 272:20986-20989.
186. Loo TW, Clarke DM. Identification of residues in the drug-binding domain of human P-glycoprotein. Analysis of transmembrane segment 11 by cysteine-scanning mutagenesis and inhibition by dibromobimane. *J Biol.Chem.* (1999) 274:35388-35392.
187. Tanabe M, Ieiri I, Nagata N et al. Expression of P-glycoprotein in human placenta: relation to genetic polymorphism of the multidrug resistance (MDR)-1 gene. *J Pharmacol.Exp.Ther.* (2001) 297:1137-1143.
188. Kim RB, Leake BF, Choo EF et al. Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans. *Clin Pharmacol.Ther.* (2001) 70:189-199.
189. Sai K, Kaniwa N, Itoda M et al. Haplotype analysis of ABCB1/MDR1 blocks in a Japanese population reveals genotype-dependent renal clearance of irinotecan. *Pharmacogenetics* (2003) 13:741-757.
190. Woodahl EL, Crouthamel MH, Bui T et al. MDR1 (ABCB1) G1199A (Ser400Asn) polymorphism alters transepithelial permeability and sensitivity to anticancer agents. *Cancer Chemother.Pharmacol.* (2009) 64:183-188.
191. Conrad S, Kauffmann HM, Ito K et al. Identification of human multidrug resistance protein 1 (MRP1) mutations and characterization of a G671V substitution. *J Hum.Genet.* (2001) 46:656-663.
192. Wojnowski L, Kulle B, Schirmer M et al. NAD(P)H oxidase and multidrug resistance protein genetic polymorphisms are associated with doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Circulation* (2005) 112:3754-3762.
193. Conrad S, Kauffmann HM, Ito K et al. A naturally occurring mutation in MRP1 results in a selective decrease in organic anion transport and in increased doxorubicin resistance. *Pharmacogenetics* (2002) 12:321-330.
194. Letourneau IJ, Deeley RG and Cole SP. Functional characterization of non-synonymous single nucleotide polymorphisms in the gene encoding human multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1). *Pharmacogenet.Genomics* (2005) 15:647-657.
195. Wang Z, Wang B, Tang K et al. A functional polymorphism within the MRP1 gene locus identified through its genomic signature of positive selection. *Hum.Mol.Genet.* (2005) 14:2075-2087.
196. Toh S, Wada M, Uchiumi T et al. Genomic structure of the canalicular multispecific organic anion-transporter gene (MRP2/cMOAT) and mutations in the ATP-binding-cassette region in Dubin-Johnson syndrome. *Am.J Hum.Genet.* (1999) 64:739-746.
197. Choi JH, Ahn BM, Yi J et al. MRP2 haplotypes confer differential susceptibility to toxic liver injury. *Pharmacogenet.Genomics* (2007) 17:403-415.
198. Itoda M, Saito Y, Soyama A et al. Polymorphisms in the ABCC2 (cMOAT/MRP2) gene found in 72 established cell lines derived from Japanese individuals: an association between single nucleotide

- polymorphisms in the 5'-untranslated region and exon 28. *Drug Metab Dispos.* (2002) 30:363-364.
199. Haenisch S, May K, Wegner D et al. Influence of genetic polymorphisms on intestinal expression and rifampicin-type induction of ABCC2 and on bioavailability of talinolol. *Pharmacogenet.Genomics* (2008) 18:357-365.
200. Naesens M, Kuypers DR, Verbeke K et al. Multidrug resistance protein 2 genetic polymorphisms influence mycophenolic acid exposure in renal allograft recipients. *Transplantation* (2006) 82:1074-1084.
201. Sookoian S, Castano G, Burgueno A et al. Association of the multidrug-resistance-associated protein gene (ABCC2) variants with intrahepatic cholestasis of pregnancy. *J Hepatol.* (2008) 48:125-132.
202. Innocenti F, Undevia SD, Chen PX et al. Pharmacogenetic analysis of interindividual irinotecan (CPT-11) pharmacokinetic (PK) variability: Evidence for a functional variant of ABCC2. *2004 ASCO Annual Meeting abs n.2010*
203. de Jong FA, Scott-Horton TJ, Kroetz DL et al. Irinotecan-induced diarrhea: functional significance of the polymorphic ABCC2 transporter protein. *Clin Pharmacol.Ther.* (2007) 81:42-49.
204. Innocenti F, Undevia SD, Rosner GL et al.. Irinotecan (CPT-11) pharmacokinetics (PK) and neutropenia: interaction among UGT1A1 and transporter genes. *2005 ASCO Annual Meeting abs n.2006.*
205. Meier Y, Pauli-Magnus C, Zanger UM et al. Interindividual variability of canalicular ATP-binding-cassette (ABC)-transporter expression in human liver. *Hepatology* (2006) 44:62-74.
206. Sookoian S, Castano G, Gianotti TF et al. Polymorphisms of MRP2 (ABCC2) are associated with susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *J Nutr.Biochem.* (2009) 20:765-770.
207. Ranganathan P, Culverhouse R, Marsh S et al. Methotrexate (MTX) pathway gene polymorphisms and their effects on MTX toxicity in Caucasian and African American patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* (2008) 35:572-579.
208. Tamura A, Wakabayashi K, Onishi Y et al. Re-evaluation and functional classification of non-synonymous single nucleotide polymorphisms of the human ATP-binding cassette transporter ABCG2. *Cancer Sci.* (2007) 98:231-239.
209. Furukawa T, Wakabayashi K, Tamura A et al. Major SNP (Q141K) variant of human ABC transporter ABCG2 undergoes lysosomal and proteasomal degradations. *Pharm.Res.* (2009) 26:469-479.
210. Mizuarai S, Aozasa N and Kotani H. Single nucleotide polymorphisms result in impaired membrane localization and reduced atpase activity in multidrug transporter ABCG2. *Int.J Cancer* (2004) 109:238-246.
211. Keskitalo JE, Pasanen MK, Neuvonen PJ et al. Different effects of the ABCG2 c.421C>A SNP on the pharmacokinetics of fluvastatin, pravastatin and simvastatin. *Pharmacogenomics.* (2009) 10:1617-1624.
212. Mizuno T, Terada T, Kamba T et al. ABCG2 421C>A polymorphism and high exposure of sunitinib in a patient with renal cell carcinoma. *Ann.Oncol* (2010) 21:1382-1383.
213. Muller PJ, Dally H, Klappenecker CN et al. Polymorphisms in ABCG2, ABCC3 and CNT1 genes and their possible impact on chemotherapy outcome of lung cancer patients. *Int.J Cancer* (2009) 124:1669-1674.
214. Balram C, Li J, Zhou QY et al.. Molecular mechanisms of interethnic differences in irinotecan disposition: Impact of variants in ABCG2. *2005 ASCO Annual Meeting Proceedings.abs n.2018.*

215. McLeod HL, Owzar K, Kroetz D et al. Cellular transporter pharmacogenetics in metastatic colorectal cancer: Initial analysis of C80203. *2008 ASCO Annual Meeting n.3513*.
216. Backstrom G, Taipalensuu J, Melhus H et al. Genetic variation in the ATP-binding cassette transporter gene ABCG2 (BCRP) in a Swedish population. *Eur.J Pharm.Sci.* **(2003)** 18:359-364.
217. Maekawa K, Itoda M, Sai K et al. Genetic variation and haplotype structure of the ABC transporter gene ABCG2 in a Japanese population. *Drug Metab Pharmacokinet.* **(2006)** 21:109-121.
218. Poonkuzhali B, Lamba J, Strom S et al. Association of breast cancer resistance protein/ABCG2 phenotypes and novel promoter and intron 1 single nucleotide polymorphisms. *Drug Metab Dispos.* **(2008)** 36:780-795.
219. Rudin CM, Liu W, Desai A et al. Pharmacogenomic and pharmacokinetic determinants of erlotinib toxicity. *J Clin Oncol* **(2008)** 26:1119-1127.
220. van Erp NP, Eechoute K, van der Veldt AA et al. Pharmacogenetic pathway analysis for determination of sunitinib-induced toxicity. *J Clin Oncol* **(2009)** 27:4406-4412.
221. Cha PC, Mushiroda T, Zembutsu H et al. Single nucleotide polymorphism in ABCG2 is associated with irinotecan-induced severe myelosuppression. *J Hum.Genet.* **(2009)** 54:572-580.
222. Romaine SP, Bailey KM, Hall AS et al. The influence of SLCO1B1 (OATP1B1) gene polymorphisms on response to statin therapy. *Pharmacogenomics.J* **(2010)** 10:1-11.
223. Han JY, Lim HS, Shin ES et al. Influence of the organic anion-transporting polypeptide 1B1 (OATP1B1) polymorphisms on irinotecan-pharmacokinetics and clinical outcome of patients with advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* **(2008)** 59:69-75.
224. Niemi M, Schaeffeler E, Lang T et al. High plasma pravastatin concentrations are associated with single nucleotide polymorphisms and haplotypes of organic anion transporting polypeptide-C (OATP-C, SLCO1B1). *Pharmacogenetics* **(2004)** 14:429-440.
225. Niemi M, Neuvonen PJ, Hofmann U et al. Acute effects of pravastatin on cholesterol synthesis are associated with SLCO1B1 (encoding OATP1B1) haplotype *17. *Pharmacogenet.Genomics* **(2005)** 15:303-309.
226. Cockcroft DW, Gault MH. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron* **(1976)** 16:31-41.
227. Tournigand C, Andre T, Achille E et al. FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. *J Clin Oncol* **(2004)** 22:229-237.
228. Butler JM, Buel E, Crivellente F et al. Forensic DNA typing by capillary electrophoresis using the ABI Prism 310 and 3100 genetic analyzers for STR analysis. *Electrophoresis* **(2004)** 25:1397-1412.
229. Fakhrai-Rad H, Pourmand N and Ronaghi M. Pyrosequencing: an accurate detection platform for single nucleotide polymorphisms. *Hum.Mutat.* **(2002)** 19:479-485.
230. Ronaghi M. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Res.* **(2001)** 11:3-11.
231. Pourmand N, Elahi E, Davis RW et al. Multiplex Pyrosequencing. *Nucleic Acids Res.* **(2002)** 30:e31.
232. Marsh S, King CR, Garsa AA et al. Pyrosequencing of clinically relevant polymorphisms. *Methods Mol.Biol.* **(2005)** 311:97-114.
233. Ranganathan P, Culverhouse R, Marsh S et al. Single nucleotide polymorphism profiling across the methotrexate pathway in normal subjects and patients with rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics.* **(2004)** 5:559-569.

234. Rohrbacher M, Kirchhof A, Geisslinger G et al. Pyrosequencing-based screening for genetic polymorphisms in cytochrome P450 2B6 of potential clinical relevance. *Pharmacogenomics*. (2006) 7:995-1002.
235. Pritchard JK, Przeworski M. Linkage disequilibrium in humans: models and data. *Am.J Hum.Genet.* (2001) 69:1-14.
236. Poujol S, Pinguet F, Malosse F et al. Sensitive HPLC-fluorescence method for irinotecan and four major metabolites in human plasma and saliva: application to pharmacokinetic studies. *Clin Chem.* (2003) 49:1900-1908.
237. Saltz LB, Kanowitz J, Kemeny NE et al. Phase I clinical and pharmacokinetic study of irinotecan, fluorouracil, and leucovorin in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol* (1996) 14:2959-2967.
238. Sloan JA, Atherton P, Reid J et al. Limited sampling models for CPT-11, SN-38, and SN-38 glucuronide. *Cancer Chemother.Pharmacol.* (2001) 48:241-249.
239. Guo SW, Thompson EA. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* (1992) 48:361-372.
240. Cecchin E, Innocenti F, D'Andrea M et al. Predictive role of the UGT1A1, UGT1A7, and UGT1A9 genetic variants and their haplotypes on the outcome of metastatic colorectal cancer patients treated with fluorouracil, leucovorin, and irinotecan. *J Clin Oncol* (2009) 27:2457-2465.
241. Toffoli G, Cecchin E, Gasparini G et al. Genotype-driven phase I study of irinotecan administered in combination with fluorouracil/leucovorin in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* (2010) 28:866-871.
242. Teufel A, Steinmann S, Siebler J et al. Irinotecan plus folinic acid/continuous 5-fluorouracil as simplified bimonthly FOLFIRI regimen for first-line therapy of metastatic colorectal cancer. *BMC.Cancer* (2004) 4:38.
243. Strassburg CP, Manns MP and Tukey RH. Differential down-regulation of the UDP-glucuronosyltransferase 1A locus is an early event in human liver and biliary cancer. *Cancer Res.* (1997) 57:2979-2985.
244. Cummings J, Zelcer N, Allen JD et al. Glucuronidation as a mechanism of intrinsic drug resistance in colon cancer cells: contribution of drug transport proteins. *Biochem.Pharmacol.* (2004) 67:31-39.
245. Huang Y, Sadee W. Membrane transporters and channels in chemoresistance and -sensitivity of tumor cells. *Cancer Lett.* (2006) 239:168-182.
246. Guo S, Zhang X, Gan L et al. Effect of poly (ethylene oxide)-poly (propylene oxide)-poly (ethylene oxide) micelles on pharmacokinetics and intestinal toxicity of irinotecan hydrochloride: potential involvement of breast cancer resistance protein (ABCG2). *J Pharm.Pharmacol.* (2010) 62:973-984.
247. Gupta E, Mick R, Ramirez J et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of the topoisomerase inhibitor irinotecan in cancer patients. *J Clin Oncol* (1997) 15:1502-1510.
248. Gupta N, Martin PM, Miyauchi S et al. Down-regulation of BCRP/ABCG2 in colorectal and cervical cancer. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* (2006) 343:571-577.
249. Balcerczak E, Panczyk M, Piaskowski S et al. ABCB1/MDR1 gene polymorphisms as a prognostic factor in colorectal cancer. *Int.J Colorectal Dis.* (2010) 25:1167-1176.
250. van der Voort van Zijp, Hoekstra HJ and Basson MD. Evolving management of colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* (2008) 14:3956-3967.

251. Iwatani Y, Shimada Y, Seima Y et al. The biological and clinicopathological characteristics of right-sided colon cancer. *Oncol Rep.* **(2000)** 7:991-994.
252. Nawa T, Kato J, Kawamoto H et al. Differences between right- and left-sided colon cancer in patient characteristics, cancer morphology and histology. *J Gastroenterol.Hepatol.* **(2008)** 23:418-423.

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio tutto il personale del laboratorio di Farmacologia Sperimentale e Clinica, nessuno escluso, che ha condiviso con me questi tre anni. Un particolare ringraziamento va alla Dott.ssa Erika Cecchin che mi ha seguito con competenza ed attenzione nella preparazione di questo lavoro.

Un pensiero speciale è rivolto sicuramente anche ai miei genitori che mi hanno sempre incoraggiata, dimostrandomi fiducia e supportandomi nel mio lavoro di ricercatrice.