

Effetti delle terapia multitarget sul superamento dei meccanismi di resistenza acquisita alle terapie anti EGFR ed anti VEGF nel carcinoma colorettaie metastatico

Progetto di ricerca di: **Antonio Galvano**

BACKGROUND E RAZIONALE

La progressione di malattia del carcinoma del colon retto avanzato (mCRC) è un evento che coinvolge l'acquisizione di numerose mutazioni genetiche che rendono la neoplasia resistente ad un determinato trattamento chemioterapico. Gli agenti chemioterapici e soprattutto più recentemente gli agenti a bersaglio molecolare sono responsabili di una pressione selettiva nei confronti delle cellule neoplastiche che portano ad un'evoluzione clonale della malattia. Diverse sono le molecole che sono coinvolte nella patogenesi e nella diffusione a distanza della neoplasia e che coinvolgono in particolar modo i processi di proliferazione cellulare e della neoangiogenesi e della diffusione metastatica (BRAF, RAS, VEGF, c-KIT, VEGFR, FLT, FGFR, c-MET, RET, PIK3CA). La conoscenza dello stato mutazionale dei geni coinvolti nel processo oncogenico è oggi di fondamentale importanza sia dal punto di vista predittivo di risposta a determinati agenti a bersaglio molecolare che dal punto di vista prognostico. In particolare nel mCRC, la valutazione dello stato mutazionale di RAS (KRAS, NRAS) e BRAF rappresenta ad oggi il momento fondamentale per ottimizzare la strategia terapeutica dei pazienti affetti da mCRC al fine di ottenere i migliori risultati possibili con i nostri trattamenti. L'assetto molecolare della neoplasia viene routinariamente valutato sul pezzo chirurgico o su biopsia tissutale, anche se questo possiede delle limitazioni dovute soprattutto alla difficoltosa ripetitività e soggette a selezione spaziale. L'utilizzo delle biopsie liquide inoltre rappresenta una evoluzione tecnica che consente di ovviare a queste problematiche e di monitorare nel corso del trattamento eventuali evoluzioni clonali. Regorafenib è un agente tirosinchinasico multitarget la cui efficacia è stata dimostrata nel mCRC a fallimento dei trattamenti standard (Anti VEGF, Anti EGFR, 5-FU, Oxaliplatino, Irinotecan). La risposta a questo trattamento non sembra influenzata dallo stato mutazionale di RAS, ma il suo meccanismo d'azione multitarget potrebbe selezionare particolari tipi di mutazioni che potrebbero influenzare una successiva scelta terapeutica.

SCOPO DELLO STUDIO

L'obiettivo di questo studio è di valutare se il trattamento con Regorafenib è in grado di selezionare particolari tipi di mutazioni in due coorti separate di pazienti (RAS WT e RAS mutati) e come queste si correlino con la prognosi. La valutazione ripetuta mediante la ricerca su plasma delle mutazioni sul DNA tumorale circolante (ctDNA) potrebbe permettere di intercettare particolari tipi di mutazioni correlate significativamente con la sopravvivenza globale e/o la sopravvivenza libera da progressione al fine di selezionare precocemente pazienti da candidare a Regorafenib o ad altro trattamento in considerazione del tipo di mutazione. Altro obiettivo è la creazione di un modello in vitro utilizzando cellule di carcinoma del colon per valutare se il trattamento con regorafenib induce particolari tipi di mutazioni di resistenza e se queste sono le stesse che compaiono con l'utilizzo di altri agenti multitarget (Nintedanib) o altri agenti a bersaglio selettivo (come il Vemurafenib – anti BRAF).

FASI DELLA RICERCA

- 1) Arruolamento consecutivo di pazienti per cui è indicato il trattamento con Regorafenib e divisione nelle due coorti (RAS WT e RAS mut)
- 2) Valutazione della storia clinica e dell'assetto mutazionale di partenza (KRAS, NRAS, BRAF) su tessuto

- 3) Inizio del trattamento con Regorafenib (4 cp/die da 40 mg – ogni ciclo è costituito da 28 giorni di terapia)
- 4) Al T0 (arruolamento) ed ogni 28 giorni il paziente viene sottoposto a prelievo ematico per la valutazione del ctDNA.
- 5) Valutazione del profilo mutazionale su ctDNA plasmatico per riscontro di eventuali differenze tra il profilo mutazionale tissutale di partenza e quello ematico
- 6) Nel caso di mancata corrispondenza, verrà valutato se il Regorafenib è in grado di modificare l'assetto mutazionale di partenza.
- 7) Correlazione con outcome maggiori (Overall survival, Progression free survival, Disease control Rate, Response rate)
- 8) Verrà inoltre creato un modello in vitro in cui le cellule di carcinoma coloretale RAS WT e RAS mut verranno sottoposte a Regorafenib e Nintedanib (altro agente multitarget con imminente indicazione nel carcinoma coloretale), per valutare se verranno riscontrati profili mutazionali differenti. In questo caso l'assetto mutazionale sarà analizzato tramite NGS (Next generation Sequencing) utilizzando lo Ion Ampliseq Colon and Lung Cancer panel per l'analisi contemporanea delle regioni target di 22 geni coinvolti nel carcinoma coloretale (KRAS, EGFR, BRAF, PIK3CA, ERBB2, PTEN, NRAS, STK11, MAP2K1, ALK, DDR2, CTNNB1, MET, TP53, SMAD4, FBXW7, FGFR3, NOTCH1, ERBB4, FGFR1, FGFR2). Se ciò avvenisse in ugual misura e con le medesime modalità con entrambi i trattamenti ciò sarebbe molto suggestivo di un sottostante meccanismo biologico dimostrandone quindi un preciso nesso di causalità. Inoltre sarà verificato se le cellule di carcinoma coloretale RAS mutate sottoposte ad entrambi i trattamenti sono capaci di mutare il loro assetto genetico e superare la resistenza agli agenti anti EGFR (Cetuximab e Panitumumab). Le stesse linee cellulari di carcinoma coloretale verranno in seguito trattate con l'agente a bersaglio selettivo Vemurafenib (anti-BRAF) per dimostrare che l'effetto sulla resistenza non sia dovuto all'azione degli agenti multitarget su un singolo bersaglio (come BRAF) ma all'azione delle stesse molecole su più target.

APPROCCIO METODOLOGICO

Estrazione del DNA libero circolante

Il sangue venoso intero (6-10 mL) sarà raccolto da pazienti all'interno provette EDTA. Tutti i pazienti forniranno il proprio consenso per la raccolta e l'analisi genetica. Il sangue intero sarà centrifugato per 10 minuti a 1200g ed il supernatante plasmatico sarà ulteriormente centrifugato per 10 minuti a 3000g. L'estratto plasmatico sarà conservato in provette a -80°C fino al momento dell'utilizzo. Il ctDNA sarà isolato usando il QIAmp circulating Nucleic Acid Kit (Quiagen) in accordo con il protocollo del fornitore. Il DNA sarà eluito in un tampone AVE e conservato a -80°C fino al suo utilizzo.

Droplet digital PCR Workflow

La Mix di reazione per l'analisi in ddPCR è composta da 2x Mastermix ddPCR (Bio-RAD) e dai saggi (sonde + primers) specifici per le mutazioni da ricercare. Tale miscela sarà quindi caricata sul droplet generator (Bio-RAD) insieme ad una soluzione oleosa (Bio-RAD) che consenta la produzione dell'emulsione acqua-olio. Una volta prodotte le droplet all'interno delle apposite cartucce, l'emulsione verrà trasferita tramite pipetta multicanale in piastre da 96 pozzetti. La piastra sarà termosaldata, posta su un termociclatore convenzionale dove avverrà l'amplificazione. Dopo la PCR, la piastra sarà letta sul sistema QX-200 (Bio-RAD). L'analisi dei dati del ddPCR sarà eseguita con il software per analisi QuantaSoft (Bio-RAD) che accompagna il lettore di gocce.

Analisi NGS

Questa metodica ci consente di valutare contemporaneamente i seguenti geni (KRAS, EGFR, BRAF, PIK3CA, ERBB2, PTEN, NRAS, STK11, MAP2K1, ALK, DDR2, CTNNB1, MET, TP53, SMAD4, FBXW7, FGFR3, NOTCH1, ERBB4, FGFR1, FGFR2) coinvolti nel carcinoma coloretale. L'analisi verrà fatta in PGM (Personal Genome Machine – Lifetechnologies) seguita da una opportuna analisi bioinformatica.

Saggi Cellulari

Una linea cellulare di carcinoma coloretale, Caco2 cell line (RAS wild type) e 2 linee cellulari di carcinoma coloretale SK-CO-1 e SW1116 (K-RAS mutata) verranno coltivate in terreno DMEM-F12 (Life Technologies) supplementato di FBS al 10% e Pen/Strep 1%. Le suddette linee cellulari verranno trattate, separatamente, con Regorafenib e Nintedanib per un tempo prolungato al fine dell'acquisizione della resistenza al farmaco. Ai fini dei trattamenti farmacologici verranno effettuati dei test di vitalità cellulare tramite il saggio MTT. 8×10^3 cellule verranno piastrate in multiwell da 96 pozzetti e trattate per 24, 48 e 72h a concentrazioni crescenti del farmaco (10 nM, 100 nM, 1 μ M, 10 μ M). Terminato il tempo di incubazione le cellule saranno incubate per 4h a 37°C con 10 μ l di MTT e l'assorbanza successivamente letta a 590 nm.

Per studiare la **proliferazione cellulare** verranno costruite delle curve di crescita attraverso conta cellulare effettuata mediante una camera di Burker.

Per **valutarne la vitalità**, le cellule verranno messe in coltura in piastre da 96 pozzetti e si utilizzerà un saggio colorimetrico MTT (CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation) contenente i Sali di Tetrazolio e la Fenazina Etansolfato che, in presenza della Deidrogenasi Mitocondriale, daranno origine al Formazano, composto color porpora solubile nel terreno di coltura. La lettura spettrofotometrica del mezzo di coltura a 490nm renderà evidenti le cellule metabolicamente attive. I risultati potranno essere confermati attraverso un saggio di vitalità con il Trypan Blue che sfrutta il principio secondo cui le cellule non vitali assorbono il colorante e si colorano in blu mentre le cellule vitali rimangono bianche. In questo caso le cellule vitali e le non vitali potranno essere discriminate e contate mediante camera di Burker.

Le **capacità invasive** delle suddette linee cellulari saranno valutate tramite saggio di invasività cellulare seminando le cellule in piccoli cestelli il cui fondo è costituito da una membrana semipermeabile coattata sul lato interno con matrigel. Questi cestelli saranno posizionati in piastre da 24 pozzetti in presenza di FBS ed incubate per 48 h. Le cellule in grado di invadere il gel ed oltrepassare la membrana verranno a questo punto colorate e contate al microscopio.

Considerazioni Statistiche

I confronti tra i dati per variabili categoriali e nominali verranno effettuati mediante l'utilizzo del test di Fisher e del Chi quadro.

Lo studio delle relazioni tra le mutazioni geniche e gli endpoint di sopravvivenza (OS, PFS, DCR, RR) al fine di valutarne un potenziale ruolo predittivo, verrà effettuato mediante il log rank test.

CRONOPROGRAMMA

Months	YEAR 1												YEAR 2												YEAR 3											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
WP 1																																				
WP 2																																				
WP 3																																				
WP 4																																				
WP 5																																				
WP 6																																				
WP 7																																				
WP 8																																				

Work Package 1	raccolta dei campioni (tessuto e plasma)
Work Package 2	genotipizzazione tumorale e caratterizzazione del ctDNA con la NGS
Work Package 3	analisi delle gocce con l'analisi digital PCR
Work Package 4	analisi bioinformatica
Work Package 5	analisi dei dati
Word Package 6	stabilizzazione delle colture e sviluppo del modello delle resistenze cellulari
Word Package 7	trattamenti e test biologici
Word Package 8	analisi dei dati

BIBLIOGRAFIA

- 1: Camaj P, Primo S, Wang Y, Heinemann V, Zhao Y, Laubender RP, Stintzing S, Giessen-Jung C, Jung A, Gamba S, Bruns CJ, Modest DP. KRAS exon 2 mutations influence activity of regorafenib in an SW48-based disease model of colorectal cancer. *Future Oncol.* 2015 Jul;11(13):1919-29. doi: 10.2217/fon.15.97. PubMed PMID: 26161928.
- 2: Wong AL, Lim JS, Sinha A, Gopinathan A, Lim R, Tan CS, Soh T, Venkatesh S, Titin C, Sapari NS, Lee SC, Yong WP, Tan DS, Pang B, Wang TT, Zec YK, Soong R, Trnkova Z, Lathia C, Thiery JP, Wilhelm S, Jeffers M, Goh BC. Tumour pharmacodynamics and circulating cell free DNA in patients with refractory colorectal carcinoma treated with regorafenib. *J Transl Med.* 2015 Feb 12;13:57. doi: 10.1186/s12967-015-0405-4. PubMed PMID: 25889309; PubMed Central PMCID: PMC4332724.
- 3: Wilhelm SM, Dumas J, Adnane L, Lynch M, Carter CA, Schütz G, Thierauch KH, Zopf D. Regorafenib (BAY 73-4506): a new oral multikinase inhibitor of angiogenic, stromal and oncogenic receptor tyrosine kinases with potent preclinical antitumor activity. *Int J Cancer.* 2011 Jul 1;129(1):245-55. doi: 10.1002/ijc.25864. Epub 2011 Apr 22. PubMed PMID: 21170960.
- 4: Lange F, Franz B, Maletzki C, Linnebacher M, Hühns M, Jaster R. Biological and molecular effects of small molecule kinase inhibitors on low-passage human colorectal cancer cell lines. *Biomed Res Int.* 2014;2014:568693. doi: 10.1155/2014/568693. Epub 2014 Sep 17. PubMed PMID: 25309914; PubMed Central PMCID: PMC4182691.
- 5: Capalbo C, Marchetti P, Coppa A, Calogero A, Anastasi E, Buffone A, Belardinilli F, Gulino M, Frati P, Catalano C, Cortesi E, Giannini G, Gulino A. Vemurafenib and panitumumab combination tailored therapy in BRAF-mutated metastatic colorectal cancer: a case report. *Cancer Biol Ther.* 2014 Jul;15(7):826-31. doi: 10.4161/cbt.28878. Epub 2014 Apr 22. PubMed PMID: 24755613; PubMed Central PMCID: PMC4100983.
- 6: Corcoran RB, Ebi H, Turke AB, Coffee EM, Nishino M, Cogdill AP, Brown RD, Della Pelle P, Dias-Santagata D, Hung KE, Flaherty KT, Piris A, Wargo JA, Settleman J, Mino-Kenudson M, Engelman JA. EGFR-mediated re-activation of MAPK signaling contributes to insensitivity of BRAF mutant colorectal cancers to RAF inhibition with vemurafenib. *Cancer Discov.* 2012 Mar;2(3):227-35. doi: 10.1158/2159-8290.CD-11-0341. Epub 2012 Jan 16. PubMed PMID: 22448344; PubMed Central PMCID: PMC3308191.
- 7: Smalley KS. PLX-4032, a small-molecule B-Raf inhibitor for the potential treatment of malignant melanoma. *Curr Opin Investig Drugs.* 2010 Jun;11(6):699-706. Review. PubMed PMID: 20496265.

8: Sala E, Mologni L, Truffà S, Gaetano C, Bollag GE, Gambacorti-Passerini C. BRAF silencing by short hairpin RNA or chemical blockade by PLX4032 leads to different responses in melanoma and thyroid carcinoma cells. *Mol Cancer Res.* 2008 May;6(5):751-9. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-07-2001. Epub 2008 May 5. PubMed PMID: 18458053.

9: Tabernero J, Lenz HJ, Siena S, Sobrero A, Falcone A, Ychou M, Humblet Y, Bouché O, Mineur L, Barone C, Adenis A, Yoshino T, Goldberg RM, Sargent DJ, Wagner A, Laurent D, Teufel M, Jeffers M, Grothey A, Van Cutsem E. Analysis of circulating DNA and protein biomarkers to predict the clinical activity of regorafenib and assess prognosis in patients with metastatic colorectal cancer: a retrospective, exploratory analysis of the CORRECT trial. *Lancet Oncol.* 2015 Jul 13. pii: S1470-2045(15)00138-2. doi: 10.1016/S1470-2045(15)00138-2. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 26184520.

10: Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, Bets D, Mueser M, Harstrick A, Verslype C, Chau I, Van Cutsem E. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2004 Jul 22;351(4):337-45. PubMed PMID: 15269313.

11: Stintzing S, Stremtzer S, Sebio A, Lenz HJ. Predictive and prognostic markers in the treatment of metastatic colorectal cancer (mCRC): personalized medicine at work. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2015 Feb;29(1):43-60. doi: 10.1016/j.hoc.2014.09.009. Review. PubMed PMID: 25475572.

PAGEARO 13/08/2015

Antonio Galea