

PROGETTO DI RICERCA

Caratterizzazione molecolare del DNA tumorale circolante (ctDNA) in pazienti con malattia linfonodale da melanoma

BACKGROUND

L'identificazione di alterazioni e profili genici utilizzabili quali biomarcatori nei tumori, insieme allo sviluppo di farmaci a bersaglio molecolare, ha aperto la strada alla medicina di precisione in oncologia. Studi di ricerca clinica hanno evidenziato come l'integrazione di criteri clinico-patologici consolidati e dati biomolecolari permetta di orientare e "plasmare" strategie di prevenzione, diagnosi e cura delle neoplasie sulla base di caratteristiche del singolo tumore del singolo paziente.

Il melanoma maligno è uno dei tumori più aggressivi ed eterogenei, mostrando una variabilità tanto nell'origine e localizzazione del tumore quanto nel profilo mutazionale, nell'ambito del quale si distinguono diversi sottogruppi quali BRAF^{mut}, RAS^{mut}, NF1^{mut}, triplo *wild-type* (negativo per mutazioni nei tre geni) [1]. Attualmente, dopo aver valutato lo stato mutazionale in una coorte numerosa (circa 850 casi) di pazienti con melanoma cutaneo dagli studi più rappresentativi basati su un'analisi mutazionale estesa mediante metodica di next-generation sequencing (NGS), sono stati proposti tre sottotipi molecolari di melanoma: BRAF^{mut}, RAS^{mut} e non-BRAF^{mut}/non-RAS^{mut} [2]. L'attivazione aberrante della cascata di traduzione del segnale RAS-RAF-MEK-ERK, nota anche come *Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) pathway* è stata documentata in oltre l'80% dei melanomi con implicazione a carico della proteina BRAF, che è una serina/treonina protein-chinasi appartenente alla famiglia delle proteine RAF (chinasi) che controlla la proliferazione cellulare.

L'oncogene BRAF è riscontrato mutato in una percentuale che va dal 40% al 60% dei melanomi maligni, nonché in percentuale di circa il 45% nel carcinoma papillare tiroideo e del 10% del carcinoma coloretale [3,4,5].

Il 90% delle mutazioni del proto-oncogene BRAF, nel melanoma, è rappresentato da una mutazione missenso in corrispondenza dell'esone 15 per sostituzione amminoacidica di un acido glutammico con una valina (BRAF V600E) [6].

La presenza della mutazione BRAF V600 permette di utilizzare farmaci diretti contro la proteina BRAF mutata e contro la proteina MEK, a valle della cascata, a sua volta attivata in maniera aberrante dalla costitutiva induzione oncogenica di BRAF mutato [7]. Le proteine BRAF mutato e MEK possono essere bersagli specifici di farmaci diretti contro di essi e volti ad inibirne l'attività, causando una interruzione della proliferazione delle cellule di melanoma. Questi farmaci si definiscono BRAF inibitori (BRAFi) e MEK inibitori (MEKi). Sulla base degli studi degli anni recenti, è stato ampiamente dimostrato che il trattamento dei pazienti affetti da melanoma BRAF mutato con la combinazione di BRAFi e MEKi è significativamente superiore in termini di efficacia e attività rispetto al trattamento con BRAFi somministrato in monoterapia [7].

I trattamenti con BRAFi e MEKi hanno dimostrato di determinare una riduzione delle lesioni tumorali di melanoma in circa il 70% dei casi.

In assenza della mutazione di BRAFV600, i farmaci BRAFi e MEKi non trovano indicazione perché quando la mutazione di BRAF non è presente la via di controllo della proliferazione cellulare dipendente da BRAF non è costitutivamente attivata, e non rappresenta quindi un bersaglio per tali farmaci. [8,9].

Un recente studio ha messo in evidenza l'eterogeneità intra ed intertumorale nell'espressione della proteina codificata dall'oncogene BRAF mutato [10]. L'eterogeneità intra-tumorale è stata riconosciuta come una caratteristica generale di molti tumori. Dal punto di vista molecolare, l'esistenza di una grande popolazione di cellule neoplastiche e subcloni geneticamente differenti è stata ampiamente dimostrata, in diversi modelli tra cui il melanoma [11,12]. Maggiore è la dimensione del tumore, maggiore è la probabilità di eterogeneità genetico-molecolare.

Nello studio pubblicato da Colombino et al., gli autori hanno riportato, in una coorte di 102 pazienti affetti da melanoma, discrepanze nei pattern di mutazione BRAFV600 tra melanoma primario e metastasi in 20 pazienti (20%) [13]. In particolare, nel 15/20 è stato segnalato uno spostamento da BRAFWT nel melanoma primario a BRAFV600 metastasi di melanoma mutato. Una recente meta-analisi ha rivelato che il tasso di discrepanza tra lesioni primarie e metastatiche era di circa il 13%, con un numero comparabile di pazienti il cui stato BRAF sta cambiando da mutazione a wild-type e da wild-type a mutazione [14]. Oltre a confermare ulteriormente il modello policlonale dei melanomi - con coesistenza di subcloni con stato BRAF diverso nelle stesse lesioni del melanoma, tali dati indicano la necessità di biopsie sequenziali durante la progressione del melanoma per la successiva analisi BRAF quando si considera il trattamento con inibitori della chinasi.

Le prove attuali supportano un modello in cui i melanomi sono essenzialmente policlonali, cioè includono una miscela di cellule che possono o non possono ospitare la mutazione BRAF. I seguenti risultati supportano ulteriormente questa nozione: a) in singole cellule degli stessi melanomi, è stata segnalata la co-occorrenza di mutazioni NRAS e BRAF [15]; e b) i pazienti che presentavano un alto grado di eterogeneità mutazionale sono stati associati a una progressione della malattia più aggressiva [16].

In sintesi, può esistere eterogeneità intra-tumorale per le mutazioni di BRAF e potrebbero verificarsi cambiamenti dello stato di BRAF nel tempo. In letteratura sono stati riportati anche casi di pazienti con melanoma sottoposto alla valutazione del linfonodo sentinella, risultato negativo, ma con lo sviluppo successivo di metastasi a distanza [17].

Sulla base, ad oggi, dell'assenza di indicatori di recidiva standardizzati, si è ipotizzata recentemente la possibilità di utilizzare, come strumento di identificazione dei pazienti a rischio di progressione verso lo stadio IV, la biopsia liquida, finalizzata alla ricerca della mutazione BRAF V600E nel ctDNA (circulating tumor DNA) nel sangue periferico [18].

L'identificazione dei pazienti con uno spostamento dello stato mutazionale BRAF è necessaria per un trattamento più accurato ed efficace dei pazienti con melanoma avanzato. Negli ultimi anni, la maggior parte degli approcci di biopsia liquida sono stati studiati per eseguire analisi di mutazione su campioni di ctDNA. Tra gli altri, uno studio su un'ampia raccolta di pazienti ha rivelato che ctDNA mutato in BRAF è stato rilevato in > 75% dei pazienti con melanoma in stadio avanzato con

tumori mutati in BRAF. Inoltre, l'assenza di ctDNA mutato in BRAF al basale sembra essere associata a tassi di risposta più elevati a dabrafenib e trametinib e una sopravvivenza libera da progressione più lunga e una sopravvivenza globale rispetto ai pazienti con ctDNA mutato in BRAF rilevabile [16].

L'analisi mutazionale di geni permette la personalizzazione del trattamento dei pazienti oncologici con farmaci a bersaglio specifico. Tuttavia nel corso del trattamento si possono selezionare cloni di cellule neoplastiche che posseggono mutazioni dello stesso gene che conferiscono la resistenza al trattamento specifico. Pertanto lo studio molecolare della neoplasia nel corso del trattamento può identificare l'insorgenza di tali mutazioni e può indicare un cambio del trattamento prima dell'insorgenza dei segni clinici della resistenza. In questo scenario effettuare l'analisi molecolare con biopsia liquida del DNA circolante. In un primo tempo questa tecnica è stata limitata dal fatto che il DNA circolante prelevato non fosse unicamente di origine tumorale e quindi l'identificazione di alleli tumorali fosse complessa. Con il miglioramento della sensibilità e dell'accuratezza delle tecniche di sequenziamento, anche la biopsia liquida si è perfezionata ed ha reso possibile l'individuazione delle aberrazioni genetiche ed epigenetiche. La biopsia liquida attualmente offre un elevato grado di specificità: questo significa che è in grado di fornire dati robusti e riproducibili in modo semplice e non invasivo. La biopsia liquida, inoltre, potrebbe fornire nuove intuizioni biologiche nel processo di metastasi e chiarire vie di segnalazione coinvolte nei processi di invasività cellulare e nella capacità di dare metastasi [18,19].

La biopsia liquida offre numerosi vantaggi pratici e potenziali: rappresenta infatti una tecnica non invasiva, indipendente dalla sede del tumore, ottenibile mediante un semplice prelievo ematico, utilizzabile anche in assenza del tumore primitivo o metastasi, ripetibile, strumento per il monitoraggio dinamico della risposta alle terapie e per lo studio dell'insorgenza di meccanismi di resistenza alla terapia.

Il fatto che le mutazioni genomiche varino non solo da paziente a paziente, ma anche nello stesso paziente nel corso del tempo, rappresenta una sfida costante nel trattamento del cancro, soprattutto nell'era della medicina di precisione.

In aggiunta, il monitoraggio su biopsia liquida nel paziente con melanoma mediante analisi delle mutazioni driver (non solo le principali in BRAF e NRAS) potrebbe essere utilizzato per seguire prospetticamente le risposte dei pazienti alla terapia nonché per lo studio di eventuali alterazioni molecolari target correlate ad eventuale resistenza alla terapia target ed all'immunoterapia fornendo una predizione di *outcome* clinico in anticipazione rispetto alle tecniche di *imaging*. La biopsia liquida, in altre parole, essendo una tecnica affidabile, economica e minimamente invasiva potrebbe essere utilizzata per dare priorità ai pazienti in modo che la progressione della malattia possa essere confermata con anticipo e la terapia del paziente possa essere mirata e pronta.

RAZIONALE

L'accurata valutazione dello stato mutazionale, tramite biopsia liquida, di B-RAF nel paziente con melanoma offre varie possibilità a partire da diverse osservazioni:

La mutazione BRAF V600E è stata infatti, in studi precedenti, associata ad una precoce presentazione in termini di età (<55 anni) ed a varianti del gene per il recettore della melanocortina-

Il MC1R, anche in melanomi non cutanei [20]. MC1R è un recettore chiave nella melanogenesi associato a G-Protein, ad alta affinità per l'ormone alfa-melanotropo (α -MSH). Il legame di quest'ultimo al recettore attiva pathway (tramite b-raf) in grado di indurre proliferazione cellulare ed incrementare la melanogenesi e di ridurre la formazione di radicali liberi in risposta alla radiazione ultravioletta, mediante la conversione di feomelanina in eumelanina, nonché di mediare l'inibizione dell'apoptosi UV-mediata. Le isoforme variate di MC1R invece, mostrano una ridotta funzione del recettore in risposta ai suoi ligandi endogeni determinando un maggiore accumulo di feomelanina e quindi, di conseguenza, di radicali liberi, cancerogeni in grado di determinare instabilità del DNA [21]. La gestione dei pazienti con malattia sistemica e BRAF mutato è particolarmente complessa in quanto l'immunoterapia si associa in parallelo con inibitori delle proteine chinasi. In tali pazienti però se da un lato la terapia ha mostrato significativi risultati nel ridurre la massa tumorale, l'efficacia rimane ancora variabile in particolare per lo sviluppo, dopo un periodo di controllo della malattia, di resistenza alla terapia stessa, limitando l'efficacia terapeutica a lungo termine, con successiva progressione di malattia [22].

MATERIALI E METODI

Lo studio prevederà l'arruolamento di pazienti con melanoma in Stadio pT1b, pT2, pT3 e pT4 (come da Linea Guida AIOM), per poi procedere alla stratificazione dei casi per presenza/assenza di ulcerazione (presenza nel primitivo di estesa regressione: $\geq 75\%$ in estensione orizzontale, secondo il protocollo del College of American Pathologists);

Lo studio includerà pazienti che saranno classificati con i seguenti criteri:

- Pazienti con melanoma in Stadio pT1b, pT2, pT3 e pT4
- Pazienti con melanoma in regressione vs. senza
- Pazienti con melanoma con mutazione BRAF vs. senza

I pazienti con indicazione per la biopsia del linfonodo sentinella mediante linfo-scintigrafia saranno suddivisi, a seconda dell'esito dell'esame istologico su biopsia linfonodale, in due gruppi:

- Gruppo A: composto da pazienti con linfonodo sentinella positivo (LS +)
- Gruppo B: composto da pazienti con linfonodo sentinella negativo (LS -)

Per la selezione preliminare dei pazienti potenzialmente eleggibili allo studio, ci si avvarrà di una valutazione presuntiva dello spessore mediante esame nevoscopico o ecografico della lesione cutanea. Seguirà conferma istologica, dopo asportazione primaria della lesione, dello spessore e la valutazione del pattern molecolare con esito di positività della mutazione BRAF-V600E.

I pazienti saranno sottoposti a prelievi ematici da vena periferica in diversi tempi al fine di determinare e monitorare quantitativamente e qualitativamente il ctDNA.

Un primo prelievo ematico da vena periferica verrà effettuato a **tutti i pazienti** eleggibili prima dell'intervento di radicalizzazione e biopsia del linfonodo sentinella (**Prelievo 1: before surgery**).

In seguito alla ripartizione dei pazienti nei due gruppi A e B precedentemente descritti, un secondo prelievo ematico verrà effettuato prima dell'inizio della terapia medica adiuvante nei pazienti LS+. Il medesimo prelievo verrà effettuato anche ai pazienti appartenenti al gruppo LS-, privi di indicazione a terapia medica adiuvante, in un tempo sovrapponibile a quello dei pazienti del gruppo LS+ (**Prelievo tempo 2: after surgery**).

Successivi prelievi verranno effettuati ogni 3 mesi in concomitanza degli esami strumentali di follow-up concordemente alle linee guida (**Prelievo tempo 3 e successivi: during follow-up**).

L'analisi mutazionale del ctDNA nel sangue intero dei pazienti con melanoma, sarà eseguita al fine di identificare i marker predittivi della risposta alla terapia e individuare un nuovo fattore prognostico per la gestione e il follow-up dei pazienti.

In particolare, per ciascun paziente verranno effettuati prelievi di campioni di sangue intero (10-12 cc provetta da emocromo con EDTA). Tra il prelievo e le successive analisi non deve intercorrere più di 4 ore, tempo massimo per il più efficace isolamento e preservazione del ctDNA.

Per il ctDNA nel sangue intero dei pazienti verrà eseguita l'estrazione e purificazione tramite l'utilizzo del QIAamp® MinElute® ccfDNA Mini kit (Qiagen) e l'analisi molecolare sarà effettuata con la piattaforma IonTorrent PGM NGS (Thermo Fisher Scientific-Life Technologies). La tecnologia di base per la preparazione della libreria consiste in un work-flow basato sull'amplificazione e barcoding mediante l'utilizzo di specifici tag.

In particolare, verrà utilizzato uno specifico saggio rappresentato da uno specifico OncoPrint Panel progettato per rilevare i driver tumorali primari e le mutazioni di resistenza, che contiene i principali geni coinvolti nella patogenesi del melanoma come BRAF, RAS, KIT, NF1, CDKN2A, CDK4, TERT, CCND1, PIK3CA, PTEN, RB1.

LUNG-MELANOMA

Download Files More Actions Preview Order

DNA

ID: OAG201535 Genome: Human (hg19) Amplicon Range: 125 - 175 bp Panel Size: 61 68 kb Wet Lab Coverage: 97.50% In Silico Coverage: 99.29% 2 Pools: 1 - 20 ng Pool 1: 452 amplicons Pool 2: 458 amplicons Genes: 29

Gene Hotspot Excluded

Core Genes - 22/27

AKT3 ARID2 BRAF CCND1 CDK4 CDKN2A CTNND1 ERBB4 E2F2 GNA11 GNAQ GRRGA HRAS IGF1R KIT KRAS MAP2K1 MDM2 MITF NF1 NRAS PIK3CA PTEN RB1 TERT TP53 TYR

Associated Research Genes - 2/30

AKT1 ATM ATR BAP1 BRCA1 BRCA2 BRD7 CD274 CHEK2 COL5A1 DACH1 DDX3X EIF1AX GNAS MET MTAP MTOR NOTCH1 NOTCH2 NOTCH3

Added Genes - 5/5

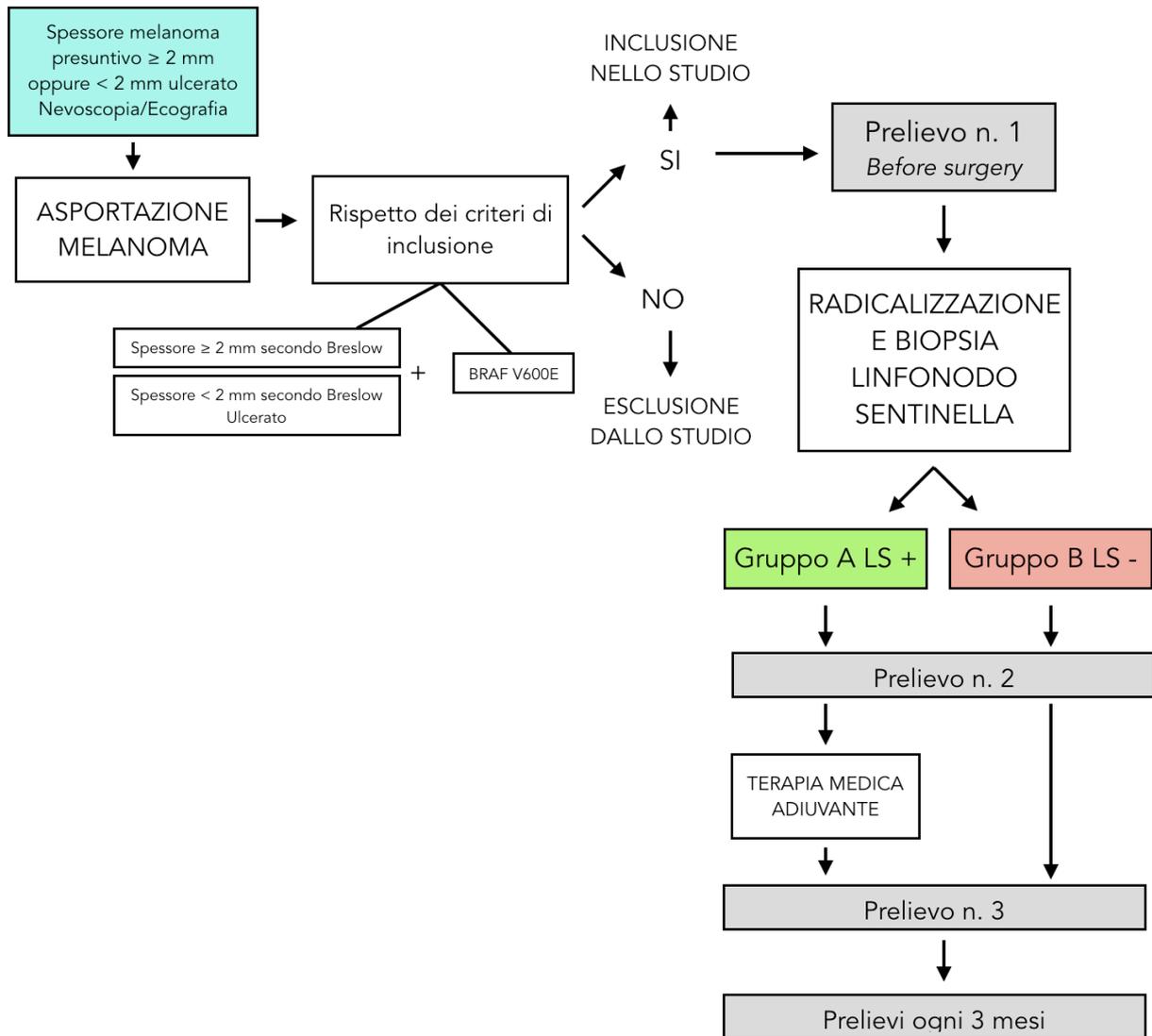
ALK EGFR ERBB2 FGFR2 FGFR3

Terms & Conditions Privacy Policy Help Regional Contact Technical & Order Support Assay Design Support FAQ Release Notes

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.
© 2020 Thermo Fisher Scientific. All Rights Reserved. Ion AmpliSeq Designer v7.4.5

Contemporaneamente utilizzare anche metodiche più sensibili ma che ci consentono di valutare solo mutazioni specifiche attraverso la droplet digital PCR (ddPCR), usando il kit ddPCR™ BRAFV600 screening Kit, che valuta le mutazioni V600E, V600R e V600K.

Schema del flusso di lavoro



OBIETTIVI DELLO STUDIO

Lo studio, mediante i metodi precedentemente esposti, vuole effettuare su prelievi ematici seriali la estrazione del DNA libero circolante per procedere ad un'indagine approfondita in Next Generation Sequencing con un pannello specifico per il melanoma per verificare lo stato mutazionale nel clone neoplastico prima di un'eventuale manifestazione clinica di resistenza.

I dati del ctDNA saranno paragonati all'evoluzione clinica ed istopatologica dei pazienti (trattati secondo le attuali linee guida) e correlati ai dati di sopravvivenza, in termini di Disease Free Survival (DFS) e Overall Survival (OS) in entrambi i gruppi A e B individuati, per indagare su un'eventuale differenza tra i due gruppi di pazienti.

Nello studio è previsto l'utilizzo un disegno derivato del "factorial-design 2x2". Saranno considerati come fattori principali la presenza di ctDNA mutato e il linfonodo sentinella positivo (LIS).

La variabile indipendente che si vuole studiare è la sopravvivenza. In particolare, la sopravvivenza globale (*overall survival*) e la sopravvivenza senza malattia (*disease free survival*). L'ipotesi di ricerca è che in presenza di ctDNA+ vi sia differenza nella OS o DSF fra i pazienti con LIS positivo e quelli con LIS negativo. In sostanza ci si riduce a un factorial design 2x2:

		LIS Negativo	LIS Positivo
ctDNA	Negativo		
	Positivo		

Per studiare la media (mediana) di OS (DFS), in una prima analisi verrà applicato un test Chi-quadro sulla tabella di contingenza 2x2 per verificare l'indipendenza della colonne. In altri termini si vuol vedere se la presenza di ctDNA influenzi il LIS. L'ipotesi nulla è che non vi sia dipendenza.

Una seconda analisi verrà effettuata per validare la possibile differenza in OS (DFS) nei diversi gruppi. Vista la robustezza, si prevede di utilizzare il test Wilcoxon signed-rank test sulle mediane e di validare il risultato con il tradizionale T-test che assume la distribuzione Gaussiana dei dati.

Le analisi di base potranno essere integrate da analisi del rischio calcolato: Cox proporzional hazard regression model e la stima Kaplan-Mayer della sopravvivenza. Dall'analisi della letteratura si è stimato che i tempi medi di sopravvivenza nella 4 condizioni imposte dalle tabelle 2x2 sono:

		LIS Negativo	LIS Positivo
ctDNA	Negativo	2 anni	1 anno
	Positivo	1 anno	6 mesi

Purtroppo l'incertezza sulla variabilità (varianza) dei tempi di sopravvivenza rende difficile stimare la taglia del campione che assicurando un errore di prima specie di 0.05, dia al contempo una potenza statistica maggiore o uguale al 80% (errore di seconda specie minore del 20%). Per ovviare a tale incertezza si è deciso di agire in due fasi. In un primo momento si è assunto che le varianze siano unitarie. La simulazione numerica, per un alfa di 0.05, porta ai seguenti risultati:

Taglia del campione	Potenza statistica (Power - Beta)
100	0.27
200	0.64
300	0.71
400	0.85

Tuttavia se si assume che la vita media in assenza di ctDNA mutato e LIS negativo sia di due anni e mezzo i dati si modificano come segue:

Taglia del campione	Potenza statistica (Power - Beta)
100	0.77
200	0.95

Vista la mancanza di informazione sulle varianze e l'incertezza sui tempi reali di sopravvivenza nelle diverse condizioni, è pertanto ragionevole attendersi un campione superiore ai 200 pazienti. Ovvero che in ciascuna cella si possano avere (in media) superiore ai 50 pazienti. Da notare che differentemente da un design fattoriale puro, nel nostro caso non è possibile assegnare a caso i pazienti a un trattamento per due ragioni. La prima è il rispetto dei protocolli in essere, la seconda è che ctDNA e LIS sono due misure ed il loro valore è determinato dalle analisi sui campioni. Tuttavia, visto che per la biopsia liquida, non sono ancora chiari gli errori di misura, si preferisce optare per una dimensione del campione il più elevata possibile in modo da mitigare gli effetti degli errori nella tecniche non ancora estremamente affidabili della biopsia liquida.

In sostanza, si prevede di avviare lo studio con l'obiettivo di reclutare almeno 200 pazienti; a partire da sei mesi, quando i primi dati di sopravvivenza saranno disponibili, si provvederà ad un monitoraggio delle media e varianze al fine di aggiustare, se necessario, la taglia del campione sulla base delle evidenze raccolte.

Nel corso del progetto si prevede di rilevare un numero di variabili secondarie utili a monitorare e interpretare le evidenze statistiche. In particolare, oltre alle variabili principali, si prevede di raccogliere l'età, il genere, l'indice di massa corporea e le variabili di rilevanza clinico-diagnostica.

BIBLIOGRAFIA

1. The Cancer Genome Atlas Network. Genomic classification of cutaneous melanoma. *Cell*. 2015; 161(7): 1681-96
2. Palmieri G, Colombino M, Casula M, Manca A, Mandalà M, Cossu A; Italian Melanoma Intergroup (IMI). Molecular pathways in melanomagenesis: what we learned from next-generation sequencing approaches. *Curr. Oncol. Rep.* 20: 86, 2018
3. Davies H, Bignelli GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002; 417; 949-54
4. Dhomen N, Marais R. BRAF signaling and targeted therapies in melanoma. *Hematol Oncol Clin North Am* 2009;23:529-45, ix.
5. Xing M. BRAF mutation in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer* 2005;12:245-62.
6. Griewank KG, Scolyer RA, Thompson JF, et al: Genetic alterations and personalized medicine in melanoma: Progress and future prospects. *J Natl Cancer Inst* 106:djt435, 2014
7. Ascierto PA, Botti G, Chiarion-Sileni V, Caracò C, Mandalà M, Massi D, Mosci C, Muto P, Palmieri G, Santinami M, Stanganelli I, Testori A. Linee Guida Melanoma 2019. In: Linee Guida della Associazione Italiana di Oncologia Medica (AIOM): <https://www.aiom.it/linee-guida-aiom-melanoma-2019/> (a cura di: Minisini AM).
8. Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM, et al. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* 2004;116:855-67.
9. Robinson M, Cobb M. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* 1997;9:180-6.

10. Betancourt L, Szasz AM, The hidden story on heterogeneous B-raf V600E mutation quantitative protein expression in metastatic melanoma-association with clinical outcome and tumor phenotypes, Preprints, 10.20944, 2019.
11. Lin J, Goto Y, Murata H, Sakaizawa K, Uchiyama A, Saida T, Takata M. Polyclonality of BRAF mutations in primary melanoma and the selection of mutant alleles during progression. *Br J Cancer* 2011; 104: 464-8
12. Grzywa TM, Paskal W. Wlodarski, Intratumor and intertumor heterogeneity in melanoma. *Transl. Oncol.* 2017, 10, 956-975
13. Colombino M, Capone M, Lissia A, Cossu A, Rubino C, De Giorgi V, Massi D, Fonsatti E, Staibano S, Nappi O, Pagani E, Casula M, Manca A, Sini MC, Franco R, Botti G, Caracò C, Mozzillo N, Ascierto PA, Palmieri G. *BRAF/NRAS* mutation frequencies among primary tumors and metastases in patients with melanoma. *J. Clin. Oncol.* 30: 2522-2529, 2012
14. Valachis A, Ullenhag GJ. Discrepancy in BRAF status among patients with metastatic malignant melanoma: A meta-analysis. *Eur J Cancer.* 2017
15. Marieke I., G. Raaijmakers, Daniel S. Widmer, et al. Co-existence of BRAF and NRAS driver mutations in the same melanoma cells results in heterogeneity of targeted therapy resistance *Oncotarget.* 2016 ; 7: 77163–77174
16. Santiago-Walker A, Gagnon R, Mazumdar J et al. Correlation of BRAF Mutation Status in Circulating-Free DNA and Tumor and Association with Clinical Outcome across Four BRAFi and MEKi Clinical Trials. *Clin Cancer Res.* 2016; 22: 567-74
17. Rocca, B. J., Ambrosio M.R., Detection of BRAFV600E mutation on papillary thyroid carcinoma and metastatic malignant melanoma by fine-needle aspiration cytology: how genetic testing may drive toward personalized medicine, *Diagnostic Cytopathology Wiley Periodicals*, 2013.
18. Palmieri G. Circulating driver gene mutations: what is the impact on melanoma patients' management? *Ann. Oncol.* 30: 669-671, 2019
19. Tabernero et al. 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 Oncology*, 2015, 10.1016/S1470-2045(15)00138-2.
20. Landi M, Bauer J, Pfeiffer R, Elder DE, Hulley B, Minghetti P, et al. MC1R germline variants confer risk for BRAF-mutant melanoma. *Science* 2006;313:521–2
21. Abdel-Malek Z, Knittel J, Kadekaro A, Swope V, Starner R. The melanocortin 1 receptor and the UV response of human melanocytes a shift in paradigm. *Photochem Photobiol* 2008; 84: 501-8
22. Manfredi L, Meyer N. Highly concordant results between immunohistochemistry and molecular testing of mutated V600E BRAF in primary and metastatic melanoma. *Acta Derm. Venereol.* 2016 96 630-4.

DURATA DELLO STUDIO

Lo studio avrà una durata di 3 anni.

ASPETTI ETICI E GOOD CLINICAL PRACTICE

L'Investigatore Responsabile dello studio garantirà che la sua conduzione avverrà in accordo al protocollo, seguendo esattamente tutte le indicazioni ivi riportate, aderendo ai Principi di Buona Pratica Clinica (*Good Clinical Practice – GCP*) e alle vigenti norme di legge, e in accordo a:

- ICH (International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration) Harmonized Tripartite Guidelines for Good Clinical Practice 2008
- Direttiva Europea 2001/20/EEC (European Economic Community)
- Declaration of Helsinki concerning medical research in humans (Helsinki 1964, amended Tokyo 1975, Venice 1983, Hong Kong 1989, Somerset West 1996, Edinburgh 2000 and Seoul 2008)

Consenso Informato

Ai partecipanti allo studio verrà richiesto di sottoscrivere il Consenso Informato, come previsto da Autorizzazione 9/2014 del Garante per Protezione dei Dati Personali (G.U. 301 del 30.12.2014), con particolare attenzione a quanto previsto per il trattamento dei dati genetici (Autorizzazione 8/2014, G.U. 301 del 30.12.2014).

In accordo con le succitate autorizzazioni, il consenso informato sarà raccolto “in tutti i casi in cui, nel corso dello studio, sarà possibile fornire un'adeguata informativa e, in particolare, laddove questi si rivolgano al centro di cura, anche per visite di controllo”.

In tal caso, l'investigatore deve spiegare ad ogni paziente (o testimone imparziale) la natura dello studio, il suo scopo, le procedure in questione, la durata prevista, i potenziali rischi e benefici e qualsiasi disagio che esso potrebbe comportare. Ogni paziente deve essere informato del fatto che la partecipazione allo studio è volontaria, che può ritirarsi dallo studio in qualsiasi momento e che il ritiro del consenso non pregiudica in alcun modo il suo successivo trattamento medico o il rapporto con il medico. Il consenso informato sarà fornito attraverso una dichiarazione scritta, redatta in un linguaggio non tecnico. Il paziente deve leggere e valutare tale dichiarazione prima di firmarla e datarla, e dovrebbe essergli data una copia del documento firmato. Se il soggetto non è in grado di leggere o firmare il documento, può essere effettuata una spiegazione orale mentre la firma può esser fatta da un testimone imparziale, specificando che il paziente non è in grado di leggere o firmare documenti. Nessun paziente può entrare nello studio prima che sia stato acquisito il suo consenso informato, che è inoltre parte del protocollo.

Protezione del paziente

I nomi dei pazienti non verranno registrati, un numero di identificazione sequenziale verrà attribuito ad ogni paziente inserito nello studio. Tale numero identificherà il paziente e dovrà essere incluso in tutti i relativi Case Report Forms.

Al fine di evitare errori di identificazione anche la data di nascita saranno riportate nei relativi Case Report Forms.

I pazienti hanno il diritto di ritirarsi dallo studio in un qualsiasi momento e per qualunque motivo, senza che questa decisione precluda la qualità dell'assistenza sanitaria che riceveranno successivamente. Inoltre, anche il Medico Responsabile dello studio, al fine della sicurezza del paziente stesso, ha la facoltà di ritirarlo dallo studio.

Gli investigatori garantiscono che tutte le persone coinvolte in questo studio rispetteranno la riservatezza delle informazioni relative ai soggetti in studio. Tutte le parti coinvolte in questo studio clinico manterranno la massima riservatezza per assicurare che né la privacy personale né quella della famiglia del paziente partecipante allo studio siano violate; misure appropriate dovranno essere assunte per evitare l'accesso di persone non autorizzate ai dati dello studio. Il trattamento dei dati personali dei pazienti che partecipano allo studio, in particolare per quanto riguarda i dati relativi al consenso, dovrà essere conforme alle leggi locali sulla privacy (legge delega 127/2001 e DL 196/2003) e alla Direttiva Europea riguardo la privacy dei dati (95/46/EC). 34

I dati e la documentazione dei pazienti saranno adeguatamente conservati per un periodo di 10 anni.

Ruolo di ciascuna unità operativa in funzione degli obiettivi previsti e relative modalità di integrazione e collaborazione

- Chirurgia plastica: reclutamento pazienti; stadiazione preoperatoria; trattamento chirurgico (allargamento/radicalizzazione e linfonodo sentinella); follow-up.
- Anatomia patologica: classificazione istologica dei tessuti escissi ed inclusi in paraffina; preparazione campioni di macrodissezione; trasmissione dei campioni al laboratorio di genetica.
- Biologia e genetica molecolare: analisi mutazionale somatica sui campioni tissutali ed ematici; interpretazione dati; correlazione tra profili genomici e parametri clinico-patologici.
- Oncologia medica: collaborazione al planning pre- e post-operatorio; valutazione delle terapie integrate alla chirurgia.

Risultati attesi dalla ricerca, loro interesse per l'avanzamento della conoscenza e le eventuali potenzialità applicative

- Individuazione di mutazioni coinvolte nella progressione dei melanomi;
- Individuazione di mutazioni correlabili a un fenotipo di malattia più aggressivo sia sul tessuto operatorio che sul DNA genomico da sangue periferico del paziente;
- Sviluppo di un marcatore genetico-molecolare da trasferire alla pratica clinica.

Elementi e criteri proposti per la verifica dei risultati raggiunti

Sarà valutato il numero di pazienti inclusi nello studio ogni mese. Sarà valutato il flusso di produzione, interpretazione e registrazione dei risultati ogni due mesi.

Costi complessivi del progetto

Voce di spesa	Unità Molecolare	Unità Clinica
Personale dipendente strutturato	€ 30.000,00	€ 20.000,00
Contratti di Ricerca	€ 25.000,00 <i>(borsista/contrattista)</i>	€ 20.000,00 <i>(data/case manager)</i>
Spese per l'acquisizione di piccole strumentazioni, attrezzature (materiale inventariabile)	€ 7.000,00	€ 0,00
Spese per materiale di consumo (kit, reagenti, prodotti chimico-biologici)	€ 78.000,00	€ 6.000,00
Spese editoriali per pubblicazioni scientifiche e reports	€ 6.000,00	€ 0,00
Spese generali (60% dei costi del personale dipendente strutturato)	€ 18.000,00	€ 12.000,00
Sub-totale da finanziare	€ 134.000,00	€ 38.000,00
Totale da finanziare complessivo	€ 172.000,00	