



**UNIVERSITÀ
DI SIENA
1240**

Dipartimento di Scienze Mediche, Chirurgiche e Neuroscienze

Dottorato in Medicina Traslazionale e di Precisione

38° Ciclo

Coordinatore Prof. Francesco Dotta

**Farmacogenetica del lenvatinib nei pazienti affetti da
carcinoma tiroideo avanzato: correlazione con gli
eventi avversi e l'outcome clinico**

Settore scientifico disciplinare: MEDS-08/A

Candidato

Dr. Alfonso Sagnella

Sede di attività: UOC Endocrinologia, Azienda Ospedaliero Universitaria Senese

Supervisore

Prof.ssa Maria Grazia Castagna

Ente di appartenenza: Università degli Studi di Siena,
Dipartimento di Scienze Mediche, Chirurgiche e Neuroscienze

Anno accademico di conseguimento del titolo di Dottore di ricerca

2024/25

INDICE

1. Introduzione.....	3
1.1 Carcinoma tiroideo differenziato avanzato	3
1.2 Lenvatinib nel trattamento del RAI-R DTC localmente avanzato o metastatico a distanza	6
1.3 Farmacocinetica e farmacogenomica del lenvatinib.....	9
2. Scopo della tesi.....	18
3. Pazienti e metodi	19
3.1 Pazienti.....	19
3.2 Raccolta dei campioni ed estrazione del DNA	20
3.3 Analisi dei polimorfismi	20
3.4 Analisi statistica	22
4. Risultati.....	24
4.1 Pazienti.....	24
4.2 Trattamento somministrato	25
4.3 Eventi avversi	26
4.4 Risposta al trattamento.....	27
4.5 Analisi dei polimorfismi	27
4.6 Determinanti clinici e farmacogenetici del dosaggio iniziale e massimo tollerato di lenvatinib	28
4.7 Determinanti clinici e farmacogenetici della tossicità relata al trattamento con lenvatinib	30
4.8 Determinanti clinici e farmacogenetici dell'outcome clinico	32
5. Discussione.....	35
6. Conclusioni.....	41
7. Bibliografia.....	42

1. Introduzione

1.1 Carcinoma tiroideo differenziato avanzato

Il carcinoma tiroideo differenziato (DTC) presenta solitamente un'ottima prognosi dopo il trattamento iniziale rappresentato dalla chirurgia (tiroidectomia totale o lobectomia) seguita o meno a seconda del rischio di persistenza/recidiva di malattia, dalla somministrazione della terapia con ^{131}I (RAI), con un tasso di sopravvivenza a 10 anni prossimo al 90% [1, 2]. Tuttavia, circa il 5% dei pazienti con DTC presenta una malattia localmente avanzata alla diagnosi, con invasione a livello degli organi cervicali [3, 4] e circa il 10% presenta metastasi a distanza, con sviluppo sincrono o metacrono rispetto alla diagnosi del tumore primitivo, con netto peggioramento della sopravvivenza globale (OS) [5].

La terapia con ^{131}I rappresenta ancora oggi il trattamento di riferimento nei pazienti con metastasi a distanza [6], eventualmente associata a terapie loco-regionali come ad esempio la radioterapia a fasci esterni (RTE), l'ablazione termica o la chirurgia [1]. Tuttavia, solo i due terzi circa di questi pazienti mostrano un uptake significativo di radioiodio, necessario per raggiungere una risposta tumorale, a livello delle lesioni ripetitive e solo il 42% di questi pazienti raggiungono un controllo e la remissione di malattia [2].

Nella restante parte dei casi parliamo di una malattia refrattaria al radioiodio (RAI-R DTC), in particolare quando (i) le metastasi a distanza non presentano uptake di ^{131}I significativo già a partire dal primo trattamento (ii) in presenza di lesioni captanti il radioiodio e di altre non captanti, (iii) in caso di perdita di capacità di uptake del radioiodio nel corso dei trattamenti successivi, (iv) in caso di progressione morfologica delle lesioni anche in presenza di uptake del radioiodio o (v) in caso di mancata risposta delle lesioni ripetitive dopo somministrazione di un'elevata attività cumulativa di ^{131}I (≥ 600 mCi) [7].

In presenza di una malattia refrattaria al radioiodio (RAI-R DTC) la prognosi è nettamente peggiore, con un tasso di sopravvivenza a 5 e 10 anni del 65% e del 10% rispettivamente e una OS mediana di 3-6 anni nelle serie storiche disponibili in Letteratura [2, 5].

Uno scenario ancora peggiore è possibile inoltre riscontrarlo nei pazienti con malattia loco-regionale avanzata [8, 9], che non hanno possibilità di beneficiare del trattamento chirurgico né della terapia con ^{131}I a causa della presenza del tumore primitivo in sede, con un tasso di sopravvivenza globale a 5 anni che si attesta attorno al 20% [10].

Fino a pochi anni fa, il trattamento dei pazienti con RAI-R DTC si basava fondamentalmente sull'utilizzo della chemioterapia associata o meno alla RTE, con un'efficacia molto limitata e sviluppo di tossicità significative [11]. Successivi studi hanno fatto luce sui meccanismi molecolari alla base dello sviluppo dei carcinomi tiroidei mettendo in evidenza l'importanza

della via delle MAP-chinasi e di PI3K/AKT/mTOR nella proliferazione delle cellule tumorali tiroidee, nella refrattarietà al radioiodio e nella neoangiogenesi a livello del tessuto neoplastico. In particolare, sono state messe in evidenza le mutazioni “driver” in grado di iniziare la tumorigenesi, tra cui le più importanti e frequenti comprendono le alterazioni a livello dei geni BRAF, RAS, RET, PAX8, NTRK e le mutazioni associate ad una maggiore aggressività tumorale e ad una minore differenziazione cellulare, come quelle a livello di TP53 e del promotore di TERT [12, 13].

Ciò ha permesso lo sviluppo di terapie target che a partire dal 2006 [14] sono entrate nell'utilizzo in pratica clinica, dapprima nell'ambito di trial sperimentali e successivamente ricevendo l'approvazione da parte dei principali Enti regolatori (FDA ed EMA) per l'utilizzo in prima linea in questo contesto clinico. In particolare, sono stati sviluppati inizialmente gli inibitori multi-chinasici (MKIs), tra cui Sorafenib, Lenvatinib e Cabozantinib che per primi hanno ricevuto l'approvazione, dopo studi di fase III che ne hanno dimostrato l'efficacia prevalentemente in termini di aumento di tempo di sopravvivenza libero da progressione di malattia (PFS) [15-17]. Questi farmaci sono piccole molecole in grado di inibire multiple tirosino-chinasi a livello della superficie cellulare e intracellulari coinvolte principalmente nella regolazione della via delle MAP-chinasi e quindi nella proliferazione cellulare e nella neoangiogenesi attraverso il recettore del vascular-endothelial growth factor (VEGFR).

Questi farmaci effettuano in questo modo un'azione citostatica a livello delle cellule tumorali, bloccandone per un certo periodo la proliferazione, almeno fino allo sviluppo di meccanismi di escape che attraverso l'attivazione di vie di segnalazione alternative, portano alla perdita di efficacia del trattamento [18].

Negli ultimi anni lo scenario sta cambiando notevolmente, con l'arrivo in pratica clinica degli inibitori tirosin-chinasici (TKIs) selettivi, diretti prevalentemente su singolo target, che hanno mostrato un maggiore tasso e rapidità di risposta associata ad un profilo di tossicità più favorevole. Abbiamo ad esempio la terapia con Dabrafenib/Trametinib, diretta principalmente al blocco della via delle MAP-chinasi attraverso l'inibizione di chinasi intracellulari come BRAF e MEK e utilizzabile nei DTC con mutazioni a livello di BRAF [19], il Selpercatinib, che esercita un blocco selettivo a livello dell'oncoproteina RET e approvato nell'utilizzo dei DTC con fusioni del gene RET [20] o ancora il Larotrectonib, utilizzabile nei carcinomi con fusioni del gene NTRK [21].

Questi farmaci hanno aperto inoltre la strada a strategie di redifferenziazione tumorale. In particolare l'utilizzo in recenti trials di tali trattamenti, ha mostrato come l'inibizione di questi driver tumorali, anche per poche settimane, sia in grado di ripristinare le vie di segnale

coinvolte nell'esposizione del NIS (sodium iodine symporter) e nell'organificazione dello iodio a livello delle cellule tumorali. Ciò permette quindi la successiva somministrazione del radioiodio, con un uptake efficace a livello delle lesioni ripetitive e l'ottenimento di una risposta al trattamento, come mostrato nei recenti trial clinici [22-25]. Infine, ulteriore strategia terapeutica sviluppata negli ultimi anni è rappresentata dall'immunoterapia, utilizzata sia in monoterapia che in associazione ai TKIs o MKIs con potenzialità ancora da esplorare. Un esempio è dato dall'utilizzo del regorafenib in associazione all'avelumab nell'ambito di un recente trial di fase II, in grado di dare una buona risposta, soprattutto nell'utilizzo in seconda linea [26].

Tutte queste terapie, nonostante l'efficacia dimostrata nei trials di fase III in termini di prolungamento della PFS, presentano ancora un impatto non del tutto chiaro a livello della OS, e soprattutto sono caratterizzate da numerosi eventi avversi in grado di influenzare significativamente in modo negativo la qualità di vita. Per tale motivo è necessario riservare questi trattamenti solo ai pazienti che possono trarne un reale beneficio e con una tempistica ottimale, in grado di bilanciarne i rischi con i benefici attesi.

Tale decisione rappresenta ancora oggi una vera e propria sfida principalmente a causa dell'ampia eterogeneità di presentazione e comportamento clinico del carcinoma tiroideo avanzato. I pazienti con RAI-R DTC metastatico possono infatti presentare una malattia caratterizzata da un andamento sostanzialmente indolente, con piccole metastasi che rimangono stabili per anni senza necessitare di alcun trattamento, o al contrario possono presentare un elevato volume di malattia con una progressione molto rapida e attraverso questi due estremi sono compresi numerosi altri scenari. Molti dei fattori prognostici sono stati individuati [2, 10, 27-34], soprattutto in studi retrospettivi e, a parte alcune eccezioni, in piccole coorti e molto resta ancora da chiarire in questo contesto clinico, soprattutto dal punto di vista delle alterazioni molecolari che potrebbero spiegare un'ampia parte della variabilità osservata clinicamente.

Inoltre, la risposta alle terapie con MKIs o TKIs può essere anch'essa molto variabile da paziente a paziente e soprattutto con un ampio ventaglio di tossicità difficile da prevedere all'inizio del trattamento e che risiede nelle caratteristiche delle cellule tumorali e soprattutto nell'interazione del farmaco con il paziente e quindi in definitiva nella farmacocinetica e nella farmacodinamica. Studiare e comprendere questi aspetti risulta quindi di fondamentale importanza per riuscire ad equilibrare il rapporto rischio/beneficio derivante da questi trattamenti e per ottenere una terapia sempre più disegnata sul singolo paziente.

1.2 Lenvatinib nel trattamento del RAI-R DTC localmente avanzato o metastatico a distanza

Il Lenvatinib fa parte della classe degli inibitori multichinasici ed è attualmente approvato in prima linea nel trattamento del RAI-R DTC localmente avanzato o metastatico a distanza. Si tratta di una piccola molecola in grado di inibire in modo non selettivo diversi target tra cui i recettori del VEGF (VEGFR1-3), i recettori per il fattore di crescita dei fibroblasti (FGFR1-4), il recettore per il fattore di crescita priastrinico (PDGFR α) e altre chinasi come KIT (mast/stem cell growth factor receptor) e RET (rearranged during transfection receptor) [35].

Dal punto di vista molecolare, questa azione è dovuta al legame con il dominio chinasi di queste proteine e in particolare con la porzione dedicata ad ospitare l'ATP e ciò ne comporta l'inibizione enzimatica con diverso grado di efficacia [36]. L'inibizione maggiore viene esercitata a livello della fosforilazione del VEGFR, per cui il lenvatinib mostra un'affinità molto elevata, con una IC₅₀ (half-maximal inhibitory concentration) nell'ordine di pochi nanomoli [37] e a livello di FGFR1 e del PDGFR, per cui però i valori di IC₅₀ sono anche 50-100 volte più elevati rispetto a quelli del VEGFR. Ciò si traduce fondamentalmente in un rallentamento/blocco della formazione di nuovi vasi e nella diminuzione della permeabilità vascolare a livello del tessuto tumorale che portano poi ad una riduzione della capacità proliferativa delle cellule neoplastiche e quindi ad una stabilizzazione/riduzione delle lesioni ripetitive target.

Il lenvatinib è un farmaco molto versatile ed è stato approvato nel trattamento di altri carcinomi oltre quello tiroideo, come nel carcinoma epatico avanzato, nel carcinoma renale metastatico e in quello endometriale in associazione all'immunoterapia con pembrolizumab [38-40].

Per quanto riguarda il carcinoma tiroideo avanzato, l'approvazione per l'utilizzo in pratica clinica risale al 2015 (da parte di EMA), a seguito dello studio multicentrico di fase III, randomizzato in doppio cieco, contro placebo denominato SELECT [16]. Tale studio ha mostrato principalmente un'efficacia in termini di PFS che passava da 3.6 mesi (nei pazienti trattati con placebo) a 18.3 mesi nei pazienti trattati con lenvatinib (HR: 0.21 [0.14-0.31] p<0.001), con un tasso di risposta del 64.8%. Nello studio non veniva evidenziato un vantaggio significativo in termini di OS, principalmente a causa del crossover, ovvero il passaggio di pazienti dal gruppo trattato con placebo alla terapia con lenvatinib al momento della progressione di malattia. Tali dati hanno portato poi rapidamente all'approvazione per

l'utilizzo in prima linea nel RAI-R DTC avanzato, anche in mancanza di studi di confronto diretto con il sorafenib, MKI già in uso ma che nello studio registrativo di fase III DECISION [15] aveva portato a benefici minori rispetto al lenvatinib.

Nello studio SELECT veniva descritto inoltre il profilo di tossicità associato alla terapia con lenvatinib con lo sviluppo di almeno un evento avverso di grado severo (\geq G3) nel 75 % circa dei pazienti trattati. Gli eventi avversi più frequenti comprendono per la maggior parte effetti dovuti all'azione antiangiogenetica e danno del microcircolo con sviluppo di ipertensione arteriosa (43% \geq G3), proteinuria (10% \geq G3), mucosite orale (4% \geq G3) e sindrome mano piede (3% \geq G3) ed eventi avversi di tipo gastro-intestinale con comparsa di diarrea (8% \geq G3), anoressia (10% \geq G3), nausea (2% \geq G3) e sistemico con calo ponderale significativo (10% \geq G3) e comparsa di fatigue (9% \geq G3).

Questi eventi avversi portavano poi alla riduzione del dosaggio terapeutico o alla sospensione transitoria o definitiva della terapia rispettivamente nel 67.8%, 82.4% e 14.2% dei casi [16]. Pertanto, tali eventi avversi in corso di terapia meritano uno stretto monitoraggio e un tempestivo trattamento, soprattutto nell'ottica di limitare quanto più possibile la necessità di ridurre/sospendere il dosaggio terapeutico somministrato, che favorirebbe l'escape delle cellule tumorali dal trattamento e la riduzione della qualità di vita del paziente.

I dati di efficacia e di sicurezza di questa terapia sono stati in seguito confermati dalle post-hoc analysis eseguite sulla coorte del trial e soprattutto da studi di real-world practice [41-47]. Bisogna comunque sottolineare che sia la risposta al trattamento che il profilo di tossicità presentati da ogni singolo paziente rimangono molto eterogenei e difficili da prevedere al momento dell'inizio della terapia.

Tali studi hanno individuato parte delle caratteristiche cliniche legate al singolo paziente e al tipo di malattia, in grado di prevedere parzialmente il profilo di risposta e di tossicità al trattamento e in grado di spiegare almeno in parte questa variabilità osservata comunemente in pratica clinica.

In particolare, per quanto riguarda l'efficacia, dal punto di vista delle caratteristiche cliniche, i pazienti che sembrerebbero ottenere un beneficio maggiore dalla terapia in termini di PFS e OS sono quelli più giovani (età \leq 65 anni) al momento dell'inizio del trattamento, con un tasso di risposta significativamente maggiore (72% vs 55% $p=0.0038$) e una durata di risposta maggiore (mediana NR vs 17 mesi) rispetto ai pazienti più anziani [41].

Oltre all'età, anche l'ECOG PS riveste particolare importanza, con i pazienti con uno stato migliore al baseline, caratterizzati da un'OS, una PFS e un tasso di risposta alla terapia nettamente migliori (HR 0.42 [CI 0.26–0.69]; $p = 0.0004$; [HR] 0.52 [CI 0.35–0.77]; $p = 0.001$ e [OR] 3.51 [CI 2.02–6.10]; $p < 0.0001$) [44].

Infine, tra le caratteristiche cliniche legate al paziente, bisogna considerare anche lo stato infiammatorio e la funzionalità del sistema immunitario. Infatti, i pazienti trattati con lenvatinib e con un rapporto neutrofilo/linfociti (NLR) più basso (<3) al baseline, sono caratterizzati da una maggiore PFS (HR 0.43 [CI 0.29–0.65]; $p < 0.0001$) e OS (HR 0.48 [CI 0.29–0.78]; $p = 0.0029$) rispetto ai pazienti con rapporto maggiore [44]. Il tessuto tumorale infatti è in grado di indurre uno stato infiammatorio attraverso la produzione di citochine, che portano all'aumento delle cellule della linea mieloide circolanti (maggiormente i neutrofilo) e alla riduzione del numero di linfociti, inficiando in tal modo la risposta immunitaria [48, 49].

Dal punto di vista della malattia, i pazienti con un volume tumorale minore rispondono meglio in termini di OS rispetto a quelli con un volume maggiore (HR, 0.56; 95% CI, 0.35–0.89; $p=0.0138$) [42] e particolare importanza è rappresentata anche dal tipo di metastasi presenti, con i siti più sfavorevoli rappresentati dal sistema nervoso (OS mediana di 5 mesi nello studio di Toraih et al [31] in pazienti trattati con diverse terapie sistemiche) e dal fegato, con un rischio di mortalità legato alla malattia molto più alto rispetto ai pazienti senza questa localizzazione (HR: 4.82, 95% CI: 1.75–13.25, $p= 0.002$) [50].

Cruciale importanza è rivestita inoltre dalla rapidità di crescita delle lesioni tumorali prima dell'inizio e durante la somministrazione della terapia sistemica. Nello studio di Sabra 2019 et al [51] eseguito con diversi TKIs, i pazienti con un tempo di raddoppiamento delle lesioni target <1 anno e che con la terapia sistemica raggiungevano un prolungamento del tempo di raddoppiamento ≥ 3 anni presentavano una OS che risultava nettamente maggiore rispetto ai pazienti che invece non ottenevano un rallentamento della progressione di malattia (4.5 anni vs 0.7 anni $p < 0.001$).

Ad oggi mancano ancora studi mirati a valutare l'impatto dell'assetto molecolare del carcinoma tiroideo avanzato nella risposta alla terapia con lenvatinib e sono disponibili solo alcune evidenze che mostrano una migliore risposta nei pazienti con alterazioni molecolari BRAF-like rispetto ai RAS.like derivanti dalle post-hoc analysis dello studio DECISION sul sorafenib [52].

Per quanto riguarda l'analisi del profilo di tossicità relata al trattamento, gli studi eseguiti successivamente al SELECT hanno evidenziato una frequenza maggiore di eventi avversi di grado ≥ 3 nei pazienti più anziani (≥ 65 anni) rispetto a quelli più giovani (89% vs 67%; $p=0.001$) e un tempo più lungo prima della riduzione del dosaggio terapeutico in questi ultimi (3.7 v 1.5 months) [41]

Uno studio multicentrico italiano [50] ha poi messo in evidenza delle differenze di genere in termini di tipologia e severità degli eventi avversi. In particolare, gli eventi avversi di tipo ematologico e a livello della mucosa orale erano più frequenti nelle donne rispetto agli uomini (17% vs 4%, $P = 0.011$; 48% vs 30%, $p = 0.016$ rispettivamente, mentre i disturbi di tipo gastrointestinale erano più frequenti negli uomini (15% vs 2%, $p = 0.010$). In modo interessante, non venivano però riscontrate differenze significative in termini di dosaggio terapeutico massimo tollerato e ciò potrebbe suggerire la presenza di ulteriori elementi coinvolti nello sviluppo degli eventi avversi oltre al dosaggio di farmaco somministrato.

Importante considerare come tale variabilità nella risposta al trattamento e nel profilo di tossicità, oltre che risiedere nelle caratteristiche cliniche e nel tipo di malattia, potrebbero risiedere anche in una differente biodisponibilità del farmaco a livello sistemico e tissutale a parità di dosaggio somministrato, dovute ad esempio a differenze nel trasporto tissutale su base individuale.

Per chiarire questo aspetto, occorrerebbe considerare studi orientati a comprendere meglio la farmacocinetica del farmaco e le differenze tra paziente e paziente in base all'assetto dei geni e degli enzimi coinvolti nel metabolismo e nella distribuzione tissutale del farmaco.

Questo potrebbe portare a chiarire attraverso l'integrazione con il dato clinico e le caratteristiche tumorali le differenze in termini di profilo di tossicità e di risposta al trattamento ancora oggi poco prevedibili al momento dell'inizio della terapia.

Altro campo di ricerca aperto sono le interazioni della terapia con lenvatinib con il microbiota intestinale del paziente [53] che potrebbero influire sulla tossicità intestinale e l'assorbimento sistemico del farmaco.

1.3 Farmacocinetica e farmacogenomica del lenvatinib

Dal punto di vista farmacocinetico, il Lenvatinib, dopo la somministrazione orale viene rapidamente assorbito a livello intestinale e trasportato a livello plasmatico principalmente legato all'albumina [54] con un'emivita di circa 28h [55]. Come evidenziato negli studi di

fase I il lenvatinib mostra una farmacocinetica lineare con un incremento dose dipendente della concentrazione plasmatica massima (C_{max}) e dell'“area under the curve” (AUC) [56-59].

Successivamente subisce un metabolismo di primo passaggio a livello epatico da parte di enzimi di fase I e II che determinano processi di idrolisi, ossidazione, idrossilazione, N-ossidazione, dealchilazione e glucuronidazione e portano alla formazione dei metaboliti (O-desmethyl lenvatinib, N-descyclopropyl lenvatinib e lenvatinib N-oxide) che non contribuiscono all'effetto terapeutico [60-62] e che vengono eliminati a livello urinario e fecale. L'inattivazione del farmaco è particolarmente efficiente e solo il 2,5% della dose somministrata viene riscontrata a livello delle urine e delle feci immodificata [60].

Secondo gli studi condotti dall'azienda farmaceutica produttrice [Eisai Inc.] e da Vavrovà e colleghi [63, 64], il citocromo P450 (CYP) e in particolare le isoforme CYP3A4 per più dell'80% e CYP3A5 per la restante parte [55] sono i principali enzimi di fase I coinvolti nell'inattivazione epatica del lenvatinib.

I farmaci che esercitano un effetto di induzione o inibizione a livello dei citocromi epatici, si sono infatti dimostrati in grado di modificare le concentrazioni plasmatiche di lenvatinib e dei suoi metaboliti in modo significativo. La somministrazione simultanea di rifampicina (noto farmaco induttore del CYP3A) ad esempio comportava una minore biodisponibilità del farmaco, con un incremento dei metaboliti inattivi del lenvatinib a livello plasmatico [65] e ad una riduzione livelli di farmaco attivo circolante (fino al -18%) mentre al contrario, la somministrazione di ketoconazolo, noto inibitore del CYP3A4 [66], incrementava leggermente l'esposizione sistemica al lenvatinib (15-19%) [64].

Oltre che da parte dei citocromi, il lenvatinib subisce anche l'azione dei trasportatori (ATP)-binding cassette (ABC) espressi a livello epatico, intestinale, renale e nelle cellule che compongono la barriera emato-encefalica, che ne determinano la disposizione a livello tissutale e ne regolano l'eliminazione a livello biliare e renale [67-69]. In particolare, i trasportatori ABC maggiormente coinvolti nella regolazione della farmacocinetica del lenvatinib sono la P-glicoproteina 1, codificata dal gene multidrug resistance 1 (MDR1) o ABCB1 e localizzata sulla superficie apicale delle cellule epiteliali e in maggior parte a livello degli enterociti, con funzione di trasportatore di efflusso e la proteina Breast Cancer Resistance Protein (BCRP), codificata dal gene ABCG2, localizzata a livello della superficie canalicolare degli epatociti, nel piccolo intestino e a livello renale e coinvolta anch'essa nell'efflusso extracellulare e nell'eliminazione del farmaco [67-69].

L'effettiva biodisponibilità del farmaco somministrato dipende quindi molto dall'azione di questi enzimi e trasportatori e variazioni nella funzionalità di queste proteine sono potenzialmente in grado di determinare un'esposizione farmacologica maggiore o minore e, di conseguenza, differenze interindividuali in termini di efficacia ed incidenza di eventi avversi a parità di dosaggio assunto [70].

Tali variazioni possono dipendere dalla somministrazione concomitante di altri farmaci interferenti con la funzionalità delle proteine coinvolte nel metabolismo, nella distribuzione tissutale e nell'eliminazione ma anche dall'assetto genetico del singolo individuo, che potrebbe presentare delle varianti a livello dei geni codificanti per tali proteine, in grado di conferire una maggiore o minore attività enzimatica o di trasporto.

I geni codificanti per i citocromi epatici e per i trasportatori ABC sono in particolare altamente polimorfici nella popolazione generale, variando notevolmente non solo tra le differenti etnie, ma anche a livello di una medesima etnia [71, 72]. Molto spesso la variazione è rappresentata da un single nucleotide polymorphism (SNP), ossia la sostituzione di una singola base del DNA in uno o entrambi gli alleli di un gene, presente nella popolazione con una frequenza pari o superiore all'1% [73].

Questo può verificarsi nella regione codificante (esone), determinando un cambiamento non sinonimo (con modifica della sequenza amminoacidica risultante) o sinonimo (senza conseguenze a livello amminoacidico), oppure in regioni non codificanti (introni), le quali possono comunque influire sulla funzionalità/espressione della proteina risultante a causa di cambiamenti nello splicing, nell'espressione genica e nella stabilità dell'mRNA risultante [74].

Questi concetti sono alla base della farmacogenomica, ovvero lo studio e l'identificazione di varianti genomiche in grado di influenzare l'effetto farmacologico attraverso l'alterazione della farmacocinetica di un farmaco o la modulazione del suo meccanismo farmacodinamico [70].

Considerando ad esempio la funzionalità dei citocromi epatici, è possibile in linea generale classificare i soggetti secondo diversi fenotipi metabolici e in particolare: (i) metabolizzatori lenti, con un'attività enzimatica notevolmente ridotta e quindi potenzialmente esposti a parità di dosaggio ad una maggiore quantità di farmaco e quindi con maggiore effetto terapeutico ma anche con maggiore tossicità ad eventi avversi; (ii) metabolizzatori intermedi, caratterizzati da una parziale riduzione dell'attività enzimatica; (iii) metabolizzatori rapidi, la cui attività enzimatica è sostanzialmente nella norma e rappresenta la condizione di riferimento; (iv) metabolizzatori ultrarapidi che presentano un'attività enzimatica aumentata

e quindi potenzialmente esposti ad una quantità di farmaco subottimale e quindi ad una minore efficacia terapeutica [75]. È importante sottolineare che tali pattern risultano invertiti nel caso dei pro-farmaci, i quali necessitano di un primo passaggio epatico per essere convertiti nella forma attiva.

L'impatto e l'utilità clinica di tali varianti geniche sono ben documentati in letteratura per alcuni farmaci. Un esempio significativo è rappresentato dal Tacrolimus, farmaco immunosoppressore utilizzato nei pazienti sottoposti a trapianto renale, la cui biodisponibilità è influenzata dai polimorfismi nei geni codificanti per i citocromi della famiglia CYP3A, determinanti per la capacità metabolizzante del singolo individuo. In particolare, i soggetti portatori del polimorfismo CYP3A5*1, soprattutto in omozigosi, presentano un metabolismo rapido del farmaco, risultando esposti a concentrazioni plasmatiche minori e, di conseguenza, a un maggiore rischio di rigetto. Al contrario, i pazienti con la variante CYP3A5*3, caratterizzati da un'attività enzimatica ridotta (se in eterozigosi) o assente (in omozigosi), raggiungono concentrazioni plasmatiche più elevate e necessitano quindi di dosaggi terapeutici inferiori per non incorrere in maggiore tossicità [76, 77]. L'analisi del genotipo del paziente prima dell'inizio della terapia riveste in questo contesto un importante valore traslazionale, poiché consente di adattare il dosaggio individuale del farmaco ottenendo il migliore rapporto rischio/beneficio.

Un altro esempio clinicamente rilevante riguarda le pazienti sottoposte a terapia adiuvante con tamoxifene dopo trattamento per carcinoma mammario ormono-sensibile. Le pazienti portatrici di due alleli CYP2D6 difettivi mostrano infatti un maggiore rischio di recidiva, in quanto presentano livelli plasmatici ridotti del metabolita attivo endoxifene e ciò determina la scelta di farmaci alternativi [78, 79].

Analogamente, i pazienti omozigoti per varianti inattive di CYP2D6 mostrano una ridotta conversione della codeina nel suo metabolita attivo morfina, con conseguente inefficacia analgesica e necessità di ricorrere a farmaci alternativi [80].

Approfondire questo aspetto è quindi cruciale, poiché consente di prevedere, prima dell'inizio del trattamento farmacologico, differenti profili di tossicità e risposta, permettendo un adattamento personalizzato della terapia.

Per quanto riguarda il lenvatinib, al momento l'aspetto farmacogenomico rimane ancora poco esplorato in Letteratura con studi eseguiti su piccole coorti e principalmente su popolazioni asiatiche. Tali studi hanno tuttavia evidenziato un possibile impatto dei

polimorfismi nei geni codificanti per le proteine coinvolte nel metabolismo e nel trasporto tissutale sulla farmacocinetica e sulla biodisponibilità del farmaco [81, 82].

Un'evidenza indiretta di tale impatto è fornita dall'osservazione di una discreta variabilità interindividuale nella concentrazione plasmatica del farmaco a parità di dosaggio somministrato. Tale variabilità risulta compresa tra il 20% circa nello studio di Ozeki e colleghi, condotto su pazienti con carcinoma tiroideo avanzato [81], e il 53% nello studio di Okubo [82], eseguito su una coorte di pazienti con carcinoma epatico avanzato non resecabile.

Questa variabilità, nello studio di Ozeki condotto su pazienti con normale funzionalità epatica, sembrerebbe attribuibile alla differente attività dei citocromi epatici e dei trasportatori ABC tra i diversi pazienti. L'importanza del metabolismo epatico troverebbe inoltre ulteriore conferma nello studio di Okubo [82], in cui la compromissione epatica comporterebbe una variabilità ancora maggiore della biodisponibilità del farmaco.

Per quanto riguarda i polimorfismi a livello dei citocromi epatici, come atteso dagli studi sulla farmacocinetica, l'impatto maggiore sembrerebbe essere attribuibile dalle varianti del gene CYP3A4.

In particolare, uno dei polimorfismi più studiato è il CYP3A4 rs2242480 (20230 G>A), caratterizzato dalla sostituzione di una guanina con un'adenina in una regione non codificante del gene (introne 10). Sebbene tale variazione non determini un cambiamento conformazionale dell'enzima risultante, essa comporta un incremento dell'attività enzimatica attraverso una maggiore trascrizione genica [83]. Ciò implica che i pazienti portatori di questa variante, soprattutto se in omozigosi, possano presentare una velocità di metabolizzazione dei substrati aumentata, e quindi una differente farmacocinetica dei farmaci somministrati.

Per quanto riguarda il lenvatinib, tale ipotesi trova riscontro nello studio di Ozeki et al [81], in cui i pazienti con questo SNP in eterozigosi o omozigosi mostravano concentrazioni plasmatiche di lenvatinib significativamente inferiori rispetto ai non portatori (4.77 vs 6.34 ng/ml/mg; $p=0.018$), senza tuttavia che tale differenza si traducesse in una diversa incidenza di eventi avversi alla terapia presentati. Un dato analogo è stato riportato anche per altri farmaci, come il tacrolimus [84], per il quale i pazienti con tale SNP presentavano una metabolizzazione più rapida.

Tuttavia, le evidenze disponibili in letteratura non risultano ancora del tutto consolidate. Alcuni studi infatti, non hanno evidenziato differenze significative nell'attività enzimatica

associata a questa variante, né per il lenvatinib [85], sebbene su una piccola coorte di 32 soggetti sani dopo singola somministrazione a basso dosaggio, né per altri farmaci. Inoltre, altri autori [83] hanno ipotizzato che la differente capacità di metabolizzare i substrati possa non dipendere esclusivamente dalla presenza del polimorfismo CYP3A4 rs2242480, ma dalla frequente associazione con varianti alleliche a livello di CYP3A5, che contribuirebbero a modificare l'attività metabolica complessiva [83, 84].

La variabilità nell'espressione del CYP3A5 è dovuta principalmente a SNPs che determinano uno splicing alternativo, con conseguente formazione di una proteina tronca e quindi assenza dell'enzima funzionante a livello tissutale [86]. In particolare, lo SNP più comune responsabile della perdita di funzione dell'enzima è l'rs776746 (6986 A>G), che introduce una sequenza di stop prematura [86]. Se presente in omozigosi, determina un fenotipo non expresser, in cui l'attività enzimatica è assente; in eterozigosi invece, conferisce un fenotipo moderatamente expresser, caratterizzato da un'attività enzimatica intermedia. È interessante notare che nella popolazione europea la presenza di questo polimorfismo è relativamente frequente, sia in eterozigosi sia in omozigosi.

Studi eseguiti prendendo in esame il lenvatinib [81, 85] non hanno mostrato differenze statisticamente significative nelle concentrazioni plasmatiche del farmaco in relazione al genotipo CYP3A5. Tuttavia nello studio di Ozeki et al, veniva osservata una tendenza verso concentrazioni plasmatiche più elevate di lenvatinib nei soggetti omozigoti per il polimorfismo -e quindi con fenotipo non expresser- rispetto agli altri (6.33 vs 4.77 ng/ml/mg; $p= 0.063$), suggerendo un possibile impatto a livello farmacocinetico da parte di questa variante.

Come già anticipato, anche i trasportatori ABC svolgono un ruolo fondamentale nell'assorbimento, nella distribuzione a livello tissutale e nell'eliminazione dei farmaci, determinando un potenziale impatto sulla loro farmacocinetica. Tuttavia, dal punto di vista clinico, l'effetto di una variante genetica in questi trasportatori risulta più difficile da prevedere, poiché potrebbe derivare non solo da variazioni nelle concentrazioni plasmatiche del farmaco, ma anche da differenze nella distribuzione a livello dei singoli tessuti. Inoltre, tali trasportatori sono espressi anche a livello delle cellule neoplastiche e possono influenzare l'efficacia terapeutica modulando la quantità di farmaco che viene trasportata all'interno della cellula.

A tal proposito, i polimorfismi più studiati riguardano la P-glicoproteina o MDR1, codificata dal gene ABCB1, frequentemente implicata nei meccanismi di escape tumorale dalla terapia.

In particolare, alcune varianti determinano un aumento dell'efflusso extracellulare dei farmaci, riducendone l'accumulo intracellulare e, conseguentemente, l'efficacia terapeutica [87, 88].

Sono stati identificati oltre 50 SNPs [89], tra cui i più frequenti rappresentati da rs1128503 (1236C>T), rs1045642 (3435C>T) e rs2032582 (2677G>T/A), tutti in grado di influenzare significativamente la farmacocinetica di diversi farmaci [90-92]. Questi polimorfismi sono inoltre in forte linkage disequilibrium tra loro, risultando spesso coereditati e potenzialmente in grado di determinare effetti combinati sul trasporto e l'efficacia dei farmaci. [89].

In particolare, per quanto riguarda il polimorfismo rs1045642 (3435C>T) si tratta di uno SNP sinonimo localizzato nell'esone 26 del gene ABCB1, ma comunque in grado di modificare l'attività della proteina tradotta. Tale variante può infatti ridurre la stabilità dell'mRNA, determinando una diminuzione dell'espressione e, di conseguenza, dell'attività del trasportatore [93]. Dal punto di vista clinico questo può tradursi in differenti implicazioni farmacocinetiche. Per quanto riguarda la farmacocinetica del lenvatinib ad esempio lo studio di Ozeki non ha riscontrato differenze significative nei pazienti portatori del polimorfismo, sebbene ci fosse una chiara tendenza verso un'esposizione più elevata al farmaco nei pazienti portatori del polimorfismo (CC 4.9 vs TT 6.02 ng/ml/mg; p=0.72). Tale differenza potrebbe riflettere una minore efficienza del trasportatore nel promuovere l'efflusso del farmaco a livello intestinale, con conseguente aumento dell'assorbimento sistemico. Tuttavia, questa alterazione farmacocinetica non si traduceva in un incremento clinicamente rilevante degli eventi avversi nei soggetti analizzati [81]. Un'osservazione analoga è stata riportata da Li et al. [85], in cui i portatori del polimorfismo presentavano livelli plasmatici di lenvatinib più elevati e una minore clearance del farmaco [85]. Questa osservazione è valida anche per altri farmaci (es. digossina, ciclosporina, chemioterapici), in cui una minore funzionalità del trasportatore sembrerebbe essere legata ad una maggiore esposizione ai substrati dei farmaci e quindi ad una maggiore efficacia e tossicità. Tuttavia le evidenze disponibili risultano a volte in parte contraddittorie e, al momento, non completamente consolidate nè associate in modo univoco a un chiaro impatto clinico [94-96].

In modo simile, lo SNP rs1128503 (1236C>T) rappresenta anch'esso un polimorfismo sinonimo che, pur non alterando la sequenza amminoacidica, è in grado di ridurre la funzione della P-glicoproteina risultando anche in questo caso in una minore clearance del farmaco somministrato e quindi in una potenziale maggiore esposizione. Tuttavia, per quanto riguarda il lenvatinib, non sono ancora disponibili evidenze chiare di un impatto significativo

a livello farmacocinetico [81, 82], sebbene sia stato descritto un effetto rilevante per altri inibitori tirosin-chinasici, come l'imatinib [97] e soprattutto in presenza concomitante di altri polimorfismi in grado di influenzare l'attività del trasportatore come rs2032582 (2677G>T/A) [98].

Per quanto riguarda tale polimorfismo, si tratta di una variante non sinonima localizzata nell'esone 21 del gene ABCB1 in grado di determinare anch'essa una riduzione del funzionamento del trasportatore e quindi una potenziale maggiore esposizione ai farmaci somministrati. Tuttavia, per quanto concerne il lenvatinib, gli studi finora disponibili non hanno evidenziato differenze significative nelle concentrazioni plasmatiche tra i diversi genotipi [81, 82].

Per concludere, un ruolo importante nella variabilità farmacocinetica dei farmaci substrato dei trasportatori ABC potrebbe essere svolto anche dai polimorfismi a livello della breast cancer resistance protein (BCRP), codificata dal gene ABCG2.

Il polimorfismo più comune, rs2231142 (421C>A), è una variante non sinonima, che sembrerebbe ridurre la stabilità della proteina tradotta a livello del reticolo endoplasmatico, favorendone la degradazione mediata dal proteasoma [99]. Una minore attività del trasportatore comporterebbe, come già osservato per la P-glicoproteina, un ridotto efflusso dei substrati e quindi una maggiore esposizione sistemica ai farmaci trasportati.

Nel caso del lenvatinib, nei pazienti portatori del polimorfismo in eterozigosi o in omozigosi, veniva osservata nello studio di Okubo su pazienti con HCC avanzato, un'esposizione sistemica maggiore (rispettivamente di 1,43 e 1.63 volte superiore rispetto ai soggetti con la sequenza di riferimento) che si traduceva inoltre dal punto di vista clinico in una più alta incidenza di anoressia tra gli eventi avversi. Osservazioni simili, con aumento della biodisponibilità del farmaco sono state riportate anche per altri inibitori tirosino-chinasici come l'imatinib [100] o il gefitinib [101] e per la rosuvastatina, farmaci substrati dello stesso trasportatore. Tuttavia, altri studi come quello di Ozeki et al [81], non evidenziavano differenze significative nelle concentrazioni plasmatiche o nel profilo di tollerabilità del lenvatinib in relazione al polimorfismo, suggerendo che l'impatto clinico di questa variante possa essere limitato o modulato da fattori concomitanti.

Nel complesso, le evidenze attualmente disponibili indicano quindi che la variabilità interindividuale nella farmacocinetica del lenvatinib può essere influenzata da polimorfismi a carico dei geni codificanti per gli enzimi metabolizzanti, in particolare CYP3A4 e CYP3A5,

e per i trasportatori di membrana ABC. Tuttavia, sebbene diversi studi abbiano suggerito un potenziale impatto di tali varianti genetiche sui livelli plasmatici del farmaco e, in alcuni casi, sulla frequenza e sulla tipologia degli eventi avversi sviluppati in corso di terapia, le evidenze disponibili rimangono eterogenee e non pienamente concordi. È quindi probabile che le differenze osservate riflettano l'interazione di fattori multipli, sia genetici che clinici, che nel loro insieme contribuiscono alla variabilità interindividuale nell'esposizione sistemica e nella risposta clinica al lenvatinib.

Lo studio di questi fattori risulta di cruciale importanza nel contesto clinico del carcinoma tiroideo avanzato, in quanto le terapie sistemiche ad oggi disponibili sono in grado di peggiorare in modo significativo la qualità di vita dei pazienti, spesso per un lungo periodo. L'identificazione in particolare di biomarcatori genetici predittivi potrebbe quindi rappresentare uno strumento utile per ottimizzare la strategia terapeutica, evitando per quanto possibile l'insorgenza di eventi avversi potenzialmente gravi e massimizzando il beneficio terapeutico, nell'ottica di una sempre maggiore personalizzazione del trattamento.

2. Scopo della tesi

L'obiettivo di questo lavoro è indagare la presenza di possibili correlazioni tra il profilo farmacogenetico individuale, valutato mediante l'analisi dei polimorfismi dei geni codificanti per i citocromi CYP3A4 e CYP3A5 e per le proteine di trasporto P-glicoproteina (ABCB1) e breast cancer resistance protein (ABCG2) e lo sviluppo di eventi avversi relati al trattamento e l'outcome clinico in una coorte di pazienti affetti da carcinoma tiroideo differenziato, localmente avanzato o metastatico a distanza, in terapia con lenvatinib.

3. Pazienti e metodi

3.1 Pazienti

Abbiamo eseguito un'analisi retrospettiva che ha coinvolto una coorte consecutiva di pazienti affetti da carcinoma tiroideo avanzato, arruolati presso i centri di riferimenti di Siena, Pisa e Milano fino al mese di luglio 2024.

I criteri di inclusione prevedevano la diagnosi di un carcinoma tiroideo differenziato, comprendente gli istotipi papillare, follicolare e scarsamente differenziato, localmente avanzato o metastatico a distanza, trattato con lenvatinib in almeno una linea terapeutica.

Sono stati esclusi dallo studio i pazienti con carcinoma tiroideo midollare (MTC) o anaplastico (ATC) e coloro che presentavano trattamenti concomitanti con farmaci interferenti con la farmacocinetica del lenvatinib o affetti da comorbidità severe tali da controindicare il trattamento.

Abbiamo raccolto dalle cartelle cliniche informatizzate dei pazienti, per un tempo di osservazione pari a 12 mesi, i dati clinici comprensivi di età alla diagnosi, sesso, misure antropometriche (peso, altezza BMI), i dati istologici e quando disponibili i dati molecolari inerenti il tumore primitivo. In particolare, per tale aspetto, nei diversi centri sono stati utilizzati differenti pannelli genici a seconda della disponibilità locale e tutti i pazienti sono stati testati almeno per alterazioni di BRAF e H/K/N RAS. In accordo con i dati disponibili in letteratura [12, 13] le alterazioni molecolari riscontrate sono poi state classificate in due gruppi e in particolare: "BRAF-like", in caso riscontro di mutazioni di BRAF, TERT, TP53 o di fusioni di NTRK e "RAS-like" in caso di mutazioni di H-K-NRAS e EGFR. I pazienti in cui l'analisi molecolare non è stata eseguita o con esito negativo con i pannelli utilizzati sono stati inseriti in un gruppo a parte.

Per ogni paziente metastatico sono stati raccolti inoltre i dati riguardo i siti anatomici coinvolti.

Per quanto riguarda la terapia somministrata abbiamo raccolto informazioni relative al dosaggio iniziale di lenvatinib, alle eventuali interruzioni (temporanee o definitive) o modifiche del trattamento, al dosaggio massimo tollerato e alla durata complessiva della terapia. In particolare, il dosaggio massimo tollerato è stato definito come la dose di lenvatinib somministrata per il maggiore numero di giorni nell'arco dei primi 12 mesi di trattamento e che ha comportato il minor numero di sospensioni temporanee della terapia dovute alla comparsa di eventi avversi.

Le informazioni relative gli eventi avversi osservati, alla loro durata e al loro grado, sono state registrate in accordo con i Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE v5.0; ultima consultazione in data 01/07/2025).

Al fine di valutare la risposta radiologica al trattamento (secondo criteri RECIST 1.1), abbiamo consultato le TC di stadiazione eseguite al baseline, al momento della risposta migliore al trattamento (best response) e al momento della progressione di malattia. Per ogni paziente è stato inoltre calcolato il tempo necessario al raggiungimento della best response. Abbiamo infine registrato la data dell'ultima visita di follow-up o del decesso nel caso dei pazienti deceduti. Tutti i pazienti hanno fornito il consenso informato prima di essere arruolati e lo studio ha ricevuto l'approvazione da parte del comitato etico locale.

3.2 Raccolta dei campioni ed estrazione del DNA

I campioni di sangue intero sono stati raccolti in provette Vacutainer contenenti anticoagulante EDTA e opportunamente conservati a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ fino all'utilizzo. Il DNA genomico è stato estratto da campioni di sangue venoso periferico mediante l'estrattore automatico EZ2 Connect (Qiagen, Paesi Bassi), utilizzando il kit EZ1&2 DNA Blood 350 uL kit (Qiagen, Paesi Bassi), seguendo le istruzioni del produttore. La concentrazione e la purezza del DNA estratto è stata determinata con l'impiego dello spettrofotometro Nano-500 (Allsheng, Cina).

3.3 Analisi dei polimorfismi

L'analisi dei polimorfismi è stata effettuata applicando le tecniche di amplificazione mediante reazione a catena della polimerasi (PCR) e successivo sequenziamento Sanger.

Tutti i pazienti sono stati genotipizzati per i polimorfismi CYP3A4 20230G>A (rs2242480), CYP3A5 6986A>G (rs776746), ABCB1 2677G>T/A (rs2032582), 3435C>T (rs1045642) e 3435+22C>T (rs2235048) e ABCG2 421C>A (rs2231142).

L'amplificazione dei frammenti genici contenenti i polimorfismi in studio è stata eseguita impiegando primers specifici, disegnati con il software Primer3 e sintetizzati da Eurofins Genomics (Ebersberg, Germania). Le sequenze dei primers sono riportate in Tabella 1. Le reazioni di PCR sono state allestite impiegando il kit FastStart Taq DNA Polimerasi (Roche, Germania) in un volume finale di reazione di 50 uL e una quantità di DNA di 400 ng secondo le indicazioni del produttore. L'amplificazione è stata condotta in un termociclatore

GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystem, Milano, Italia) secondo il programma riportato in Tabella 2.

I prodotti di amplificazione sono stati visualizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio al 2,5% in tampone TAE 1X, quindi purificati con Exosap-IT (Applied Biosystem, Milano, Italia) secondo le istruzioni del produttore. Il sequenziamento Sanger è stato eseguito impiegando il kit BidDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing in combinazione con BigDye XTerminator Purification kit (Applied Biosystems, Milano, Italia). Le reazioni di sequenziamento sono state condotte su sequenziatore capillare automatizzato SeqStudio (Applied Biosystem, Milano, Italia).

Gli elettroferogrammi originati dal sequenziatore sono stati visualizzati mediante l'utilizzo del programma Chromas (Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, Australia, <https://technelysium.com.au/wp/chromas/>, versione 2.6.6), mentre le sequenze nucleotidiche sono state allineate e confrontate con le sequenze di riferimento mediante il database Ensembl (EMBL-EBI e Wellcome Trust Sanger Institute, Hinxton, Regno Unito, <https://www.ensembl.org/index.html>, versione 115).

Genes	SNPs	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
<i>CYP3A4</i>	rs2242480	CTTAGGGATTTGAGGGCTTCA	TTCTCCTGGGAAGTGGTGAG
	rs2032582	ATAGGTTCCAGGCTTGCTGT	ACTGGCTTTGCTACTTTCTGT
<i>ABCB1</i>	rs1045642	GTGTGCTGGTCCTGAAGTTG	AAGGGTGTGATTTGGTTGCT
	rs2235048	GTGTGCTGGTCCTGAAGTTG	AAGGGTGTGATTTGGTTGCT
<i>ABCG2</i>	rs2231142	GGCTTTGCAGACATCTATGGA	CACATTACCTTGGAGTCTGCC
<i>CYP3A5</i>	rs776746	TGGAGAGTGGCATAGGAGAT	TGGATGCTTACCCTTCGATTTG

Tabella 1: sequenze primers.

Fase	Temperatura e tempo	Numero cicli
Denaturazione iniziale	95°C, 10 minuti	1
Denaturazione	95°C, 1 minuto	37
Annealing	60°C, 1 minuto	37
Estensione	72°C, 1 minuto	37
Estensione finale	72°C, 10 minuti	1
Cooling	4°C, infinito	

Tabella 2: Condizioni PCR end-point.

3.4 Analisi statistica

I dati qualitativi sono stati espressi come numeri assoluti e percentuali, mentre i dati quantitativi sono stati riportati come mediana e range o intervallo interquartile (IQR), oppure come media e deviazione standard (DS), in base alla distribuzione delle variabili.

Le correlazioni tra variabili continue sono state valutate mediante coefficiente di correlazione di Spearman.

Per il confronto tra variabili categoriche e quantitative sono stati utilizzati il test Mann–Whitney, mentre nel caso dell’ECOG Performance Status — variabile con più di due categorie — è stato impiegato il test Kruskal–Wallis.

Le associazioni tra variabili categoriche sono state analizzate utilizzando il test del χ^2 o, quando appropriato, il test esatto di Fisher.

Gli odds ratio (OR) e i relativi intervalli di confidenza al 95% (IC95%) sono stati calcolati per valutare le associazioni tra variabili cliniche o genetiche e la comparsa di specifici eventi avversi.

Progression-Free Survival e l'Overall Survival sono state calcolate dal momento dell'inizio del trattamento con lenvatinib fino, rispettivamente, alla data di progressione o al decesso. I pazienti ancora vivi o liberi da progressione al momento dell'ultima valutazione sono stati censurati alla data dell'ultimo follow-up.

Le curve di sopravvivenza sono state stimate mediante curve di Kaplan–Meier, e le differenze tra i gruppi sono state valutate con il Log-rank test.

È stata inoltre condotta un'analisi multivariata mediante regressione stepwise (modello di Cox per la sopravvivenza e modello lineare per il dosaggio massimo tollerato), includendo le variabili risultate significative all'analisi univariata o considerate clinicamente rilevanti.

L'equilibrio di Hardy–Weinberg per ciascun polimorfismo genetico è stato verificato utilizzando il calcolatore online Science Primer – Hardy-Weinberg Equilibrium Calculator (<https://scienceprimer.com/hardy-weinberg-equilibrium-calculator>; accesso: ottobre 2025).

Un valore di $p < 0.05$ è stato considerato statisticamente significativo. Tutte le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il software R v.4.4.2 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

4. Risultati

4.1 Pazienti

Sono stati inclusi nello studio 48 pazienti affetti da carcinoma tiroideo differenziato avanzato, le cui caratteristiche clinico-patologiche sono riportate di seguito (Tab.3).

Parametri	48 pazienti n (%)
Età inizio del trattamento (anni)	
Mediana [IQR]	65.5 [58.4-74.1]
Genere	
Femmine	27 (56.2)
Peso (Kg)	
Mediana [IQR]	78.00 [63.8-85]
BMI (Kg/m²)	
Mediana [IQR]	26.8 [24.2-30.6]
Istologia	
PTC	26 (54.2)
FTC	9 (18.7)
PDTC	13 (27.1)
Localizzazione malattia	
Metastatico a distanza	42 (87.5)
Localmente avanzato	6 (35.4)
Metastasi distanza	
Polmone	34 (70.8)
Linfonodi mediastinici	24 (50)
Osso	19 (39.6)
Altre sedi	7 (14.5)
Analisi molecolare *	
H-K-NRAS	12 (24)
BRAF	11 (22)
TERT	11 (22)
TP53	3 (6)
EGFR	1 (2)
Riarrangiamento NTRK	2 (4)
Negativa	10 (20)
Non eseguita	6 (12.5)
ECOG PS	
0	38 (79.2)
1-2	10 (20.8)

Tabella 3. Caratteristiche clinico-patologiche della coorte di studio (*Percentuali calcolate sul totale delle alterazioni molecolari riscontrate e dei test negativi (n=50). IQR: range interquartile;

ECOG PS: ECOG performance status; PTC: carcinoma tiroideo papillare; FTC: carcinoma tiroideo follicolare; PDTC: carcinoma tiroideo scarsamente differenziato).

Il 43.8% (n=21) dei pazienti erano di sesso maschile e l'età mediana all'inizio del trattamento era di 65.5 anni [IQR 58.4-74.1]. Il peso mediano pretrattamento era di 78 kg [IQR 63.8–85] mentre il BMI mediano risultava pari a 26.8 kg/m² [IQR 24.2–30.6].

Dal punto di vista istologico 35 pazienti (72.9%) presentavano un istotipo ben differenziato (26 PTC e 9 FTC), mentre 13 pazienti (27.1%) un istotipo scarsamente differenziato. La maggior parte (87.5%) aveva metastasi a distanza e il 35.4% mostrava un tumore primitivo localmente avanzato. Tra le sedi metastatiche, il polmone risultava più frequentemente coinvolto (70.8%), seguito dai linfonodi mediastinici (50%) e dell'osso (39.6%). Localizzazioni meno comuni includevano il fegato (8.3%), l'encefalo (4.2%) e il surrene (2.1%).

Un'analisi molecolare è stata eseguita in 42 pazienti (87.5%) a livello del tumore primitivo (66.7%) o, in alternativa su metastasi loco-regionali o a distanza (33.3%). Le alterazioni molecolari più frequentemente riscontrate comprendevano mutazioni di H-K-NRAS (n=12; 24%), BRAF (n=11; 22%) e TERT (n=11; 22%), seguite da TP53 (n=3; 6%), EGFR (n=1; 2%) e dalle fusioni di NTRK (n=2; 4%), mentre in 10 casi (20%) non venivano riscontrate alterazioni con i pannelli disponibili nei singoli centri.

La maggior parte dei pazienti presentava buone condizioni di salute all'inizio del trattamento, con un ECOG performance status (PS) pari a 0 (79.2%), mentre solo una piccola parte della coorte mostrava limitazioni funzionali dovute alla patologia, con 9 pazienti (18.8%) che presentavano un ECOG PS di 1 e un paziente (2.1%) un ECOG PS di 2.

4.2 Trattamento somministrato

Il dosaggio iniziale di lenvatinib era di 24 mg/die in 27 pazienti (56.2%), compreso tra 14 e 20 mg/die in 15 pazienti (31.3%) e inferiore a 14 mg/die in 6 pazienti (12.5%).

Durante i primi 12 mesi di trattamento, si osservava una riduzione significativa del dosaggio terapeutico somministrato ($p=0.001$) a causa della comparsa di eventi avversi. Nel corso del primo anno di terapia, soltanto 9 pazienti (18.8%) tolleravano la dose piena di 24 mg/die, mentre 29 pazienti (60.4%) assumevano un dosaggio compreso tra 14 e 20 mg/die e 10 pazienti (20.8%) dosi inferiori a 14 mg/die.

Dopo 12 mesi, 44 pazienti (91.7%) risultavano ancora in trattamento con lenvatinib, mentre una sospensione definitiva della terapia veniva registrata in 4 casi di cui 2 (4.2%) per

progressione di malattia, 1 (2.1%) per tossicità relata al trattamento e 1 (2.1%) per decisione del paziente.

4.3 Eventi avversi

La distribuzione e la tipologia degli eventi avversi (AE) osservati risultavano sovrapponibili a quelle riportate nello studio registrativo SELECT, sia per frequenza che per grado (Fig.1)

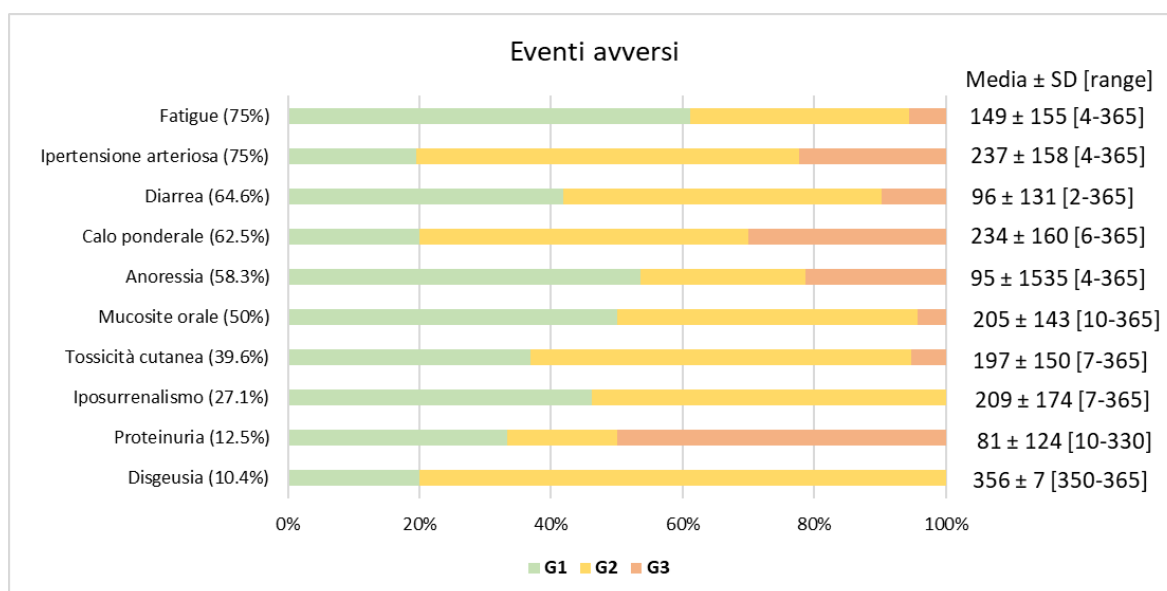


Figura 1. Tipo, durata (media ± SD e range) e severità degli eventi avversi in corso di trattamento

Gli eventi avversi più comuni erano la fatigue (n=36; 75%) e l’ipertensione arteriosa (n= 36; 75%) seguite da diarrea (n=31; 64.6%), anoressia (n=28; 58.3%), mucosite orale (n= 24; 50%), sindrome mano piede (n=9; 39.6%).

Eventi meno frequenti includevano iposurrenalismo (n=13; 27.1%), proteinuria (n=6; 12.5%) e disgeusia (n=5; 10.4%).

Il numero mediano di eventi avversi per paziente era pari a 2, con 23 pazienti (47.9%) che presentavano un numero di AE ≥5. Nel 50% dei casi, il grado massimo registrato era ≥G2 e gli AE che più frequentemente raggiungevano il grado 3 erano la proteinuria (50%), il calo ponderale (30%), l’ipertensione arteriosa (22.2%) e l’anoressia (21.4%). Non sono stati osservati eventi di grado G4 o G5.

Nel 56.1% dei pazienti gli eventi avversi avevano una durata superiore a 4 mesi. Le tossicità più prolungate includevano la disgeusia (356 ± 7 giorni), l’ipertensione arteriosa (237 ± 158

giorni), il calo ponderale (234 ± 160 giorni), l'iposurrenalismo (209 ± 174) la mucosite orale (205 ± 143 giorni) e la sindrome mano-piede (197 ± 150 giorni).

4.4 Risposta al trattamento

La maggior parte dei pazienti ($n=31$; 64.6%) ha ottenuto una risposta parziale, con una riduzione della somma dei diametri massimi delle lesioni target superiore o uguale al 30%; una stabilizzazione di malattia si osservava nel 33.3% dei casi ($n=16$), mentre solo 1 paziente (2.1%) mostrava una progressione di malattia come migliore risposta (BR).

Il tempo mediano al raggiungimento della BR era di 213 giorni [IQR: 121 - 312], con il 57.4% dei pazienti che raggiungeva la migliore risposta dopo 6 mesi dall'inizio della terapia. Al termine del follow-up (mediana 47.7 mesi; IQR: 36.0 – 64.6), la sopravvivenza globale mediana non era stata ancora raggiunta, mentre la PFS mediana risultava pari a 57.5 mesi [49.7-NA] (Fig.2 A e B)

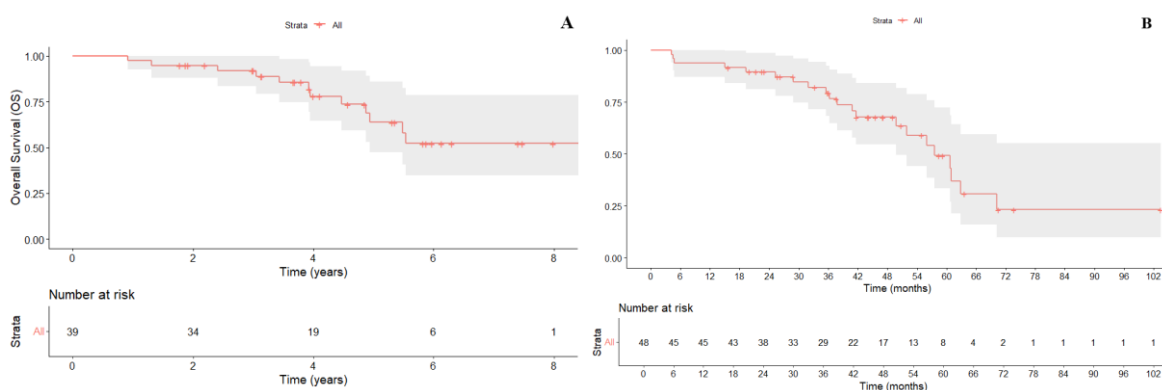


Figura 2. A. Overall survival; B. Progression free survival

4.5 Analisi dei polimorfismi

Sono stati analizzati sei SNPs a livello dei geni codificanti per enzimi coinvolti nel metabolismo epatico del lenvatinib CYP3A4 (rs2242480), CYP3A5 (rs776746) e nel trasporto tissutale ABCB1 (rs1045642, rs2032582, rs2235048) e ABCG2 (rs2231142). Tutti i polimorfismi risultavano distribuiti in accordo con l'equilibrio di Hardy-Weinberg, con frequenze genotipiche sovrapponibili a quelle della popolazione europea di riferimento. I risultati dell'analisi eseguita sono riportati di seguito (Tab.4).

Gene	Polimorfismo	Tipo SNP (Database Ensembl)	Frequenza allelica nostra coorte (%)	Frequenza allelica popolazione Europea (%)	Genotipo n=48 (%)
<i>CYP3A4</i>	rs2242480	Intronic	G: 92.7	G: 90.6	GG: 42 (87.5)
			A: 7.3	A: 9.4	GA: 5 (10.4) AA: 1 (2.1)
<i>CYP3A5</i>	rs776746	Splice acceptor variant	C: 94.8	C: 93.1	CC: 44 (91.7)
			T: 5.2	T: 6.9	CT: 3 (6.2) TT: 1 (2.1)
<i>ABCB1</i> (<i>p-glycoprotein</i>)	rs2032582	p.S893A	G: 61.5	G: 55.6	GG: 19 (39.6)
			T: 38.5	T: 44.4	GT: 21 (43.7) TT: 8 (16.7)
			C: 53.1	C: 53	CC: 15 (31.2)
rs1045642	p.Ile1145Met	T: 46.9	T: 47	CT: 21 (43.8) TT: 12 (25)	
	rs2235048	Intronic	C: 45	C: 52	CC: 12 (25)
			T: 55	T: 48	CT: 19 (39.6) TT: 17 (35.4)
<i>ABCG2</i> (<i>BCRP</i>)	rs2231142	p.Gln141Glu	C: 90.6	C: 89.1	CC: 41 (85.4)
			A: 9.4	A: 10.9	CA: 5 (10.4) AA: 2 (4.2)

Tabella 4. Analisi dei polimorfismi nella coorte di studio (in grassetto genotipo di riferimento).

4.6 Determinanti clinici e farmacogenetici del dosaggio iniziale e massimo tollerato di lenvatinib

L'analisi delle correlazioni tra variabili cliniche e dosaggio iniziale di lenvatinib evidenziava una correlazione inversa significativa con l'età ($p = -0.445$; $p = 0.002$), con i pazienti più giovani che ricevevano quindi un dosaggio più elevato all'inizio del trattamento (Fig.3).

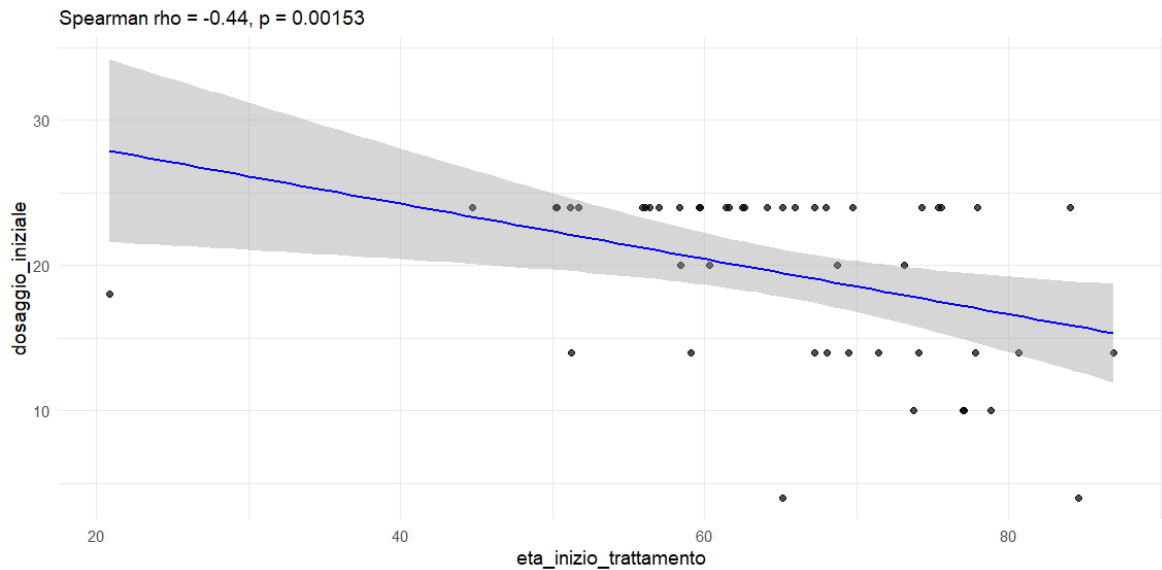


Figura 3. Correlazione tra età all'inizio della terapia e dosaggio iniziale di lenvatinib

Non emergeva invece un impatto significativo di altre variabili cliniche, inclusi il genere ($p=0.44$), il peso ($p=0.54$) e l'ECOG PS ($p=0.40$) sulla scelta del dosaggio terapeutico iniziale.

Tali fattori risultavano invece importanti nel determinare il dosaggio massimo tollerato di lenvatinib. In particolare, il peso corporeo mostrava una correlazione positiva con la dose somministrata nel corso dei primi 12 mesi di terapia, indicando che i pazienti con peso maggiore erano in grado di tollerare dosaggi mediamente più elevati ($p=0.388$, $p=0.006$; Fig.4). Inoltre, i maschi tolleravano dosaggi terapeutici superiori rispetto alle donne (mediana 20 mg/die [14-20] vs 14 mg/die [10-19], $p=0.04$), così come i pazienti con un migliore ECOG PS (mediana 14 mg/die [14-20] nei pazienti con ECOG 0 vs 14 mg/die [10-14] nei pazienti con ECOG 1-2; $p=0.023$). Non venivano evidenziate invece correlazioni significative con l'età all'inizio del trattamento e con i genotipi analizzati.

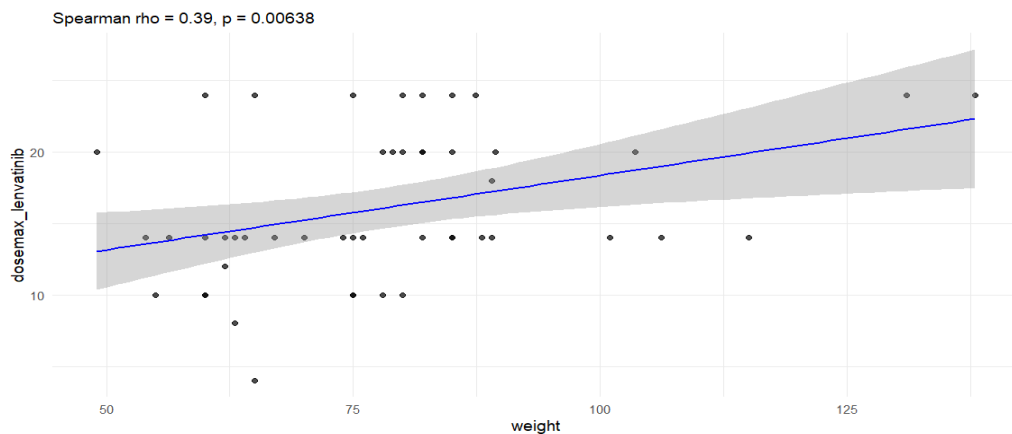


Figura 4. Correlazione tra peso e dosaggio massimo tollerato

All'analisi multivariata mediante modello di regressione lineare stepwise, che includeva il peso corporeo, il genere e i polimorfismi del gene ABCB1, il peso risultava l'unica variabile indipendentemente associata al dosaggio massimo tollerato di lenvatinib ($\beta=0.093$, $p=0.019$).

4.7 Determinanti clinici e farmacogenetici della tossicità relata al trattamento con lenvatinib

Abbiamo successivamente analizzato le possibili associazioni tra le caratteristiche cliniche e farmacogenetiche dei pazienti e il numero, il tipo, la durata e il grado degli eventi avversi relati al trattamento.

Dal punto di vista clinico abbiamo riscontrato un'associazione significativa tra l'età all'inizio del trattamento e l'incidenza dell'evento avverso "fatigue" nel corso dei primi 12 mesi di terapia. I pazienti con età più avanzata (≥ 65 anni) presentavano infatti più spesso tale evento avverso rispetto ai soggetti più giovani (84.8% vs 53.3%, OR 4.90 [IC 95%: 1.22–19.69]; $p=0.04$) (Fig.5).

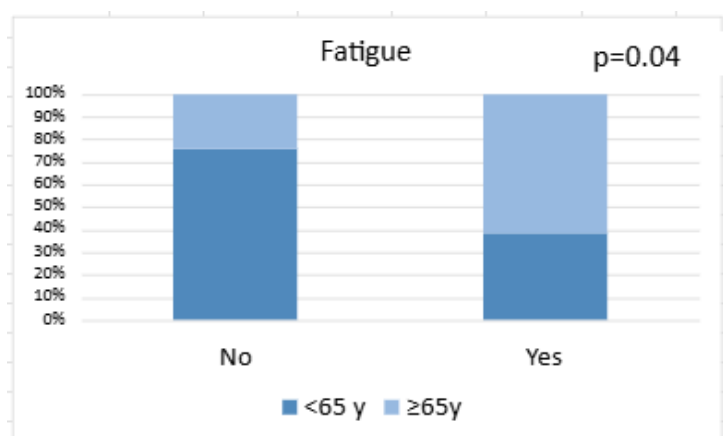


Figura 5. Associazione tra fatigue ed età all'inizio del trattamento

Abbiamo riscontrato inoltre un'associazione significativa tra il peso, considerato come variabile continua e l'incidenza di disgeusia, con i pazienti con un peso maggiore più spesso interessati da questo evento avverso (OR 1.06; IC 95% 1.01–1.12; $p=0.022$). In particolare, i pazienti che hanno sviluppato disgeusia presentavano un peso mediano di 103.5 kg rispetto ai 76.0 kg dei pazienti senza tale evento (Fig.6).

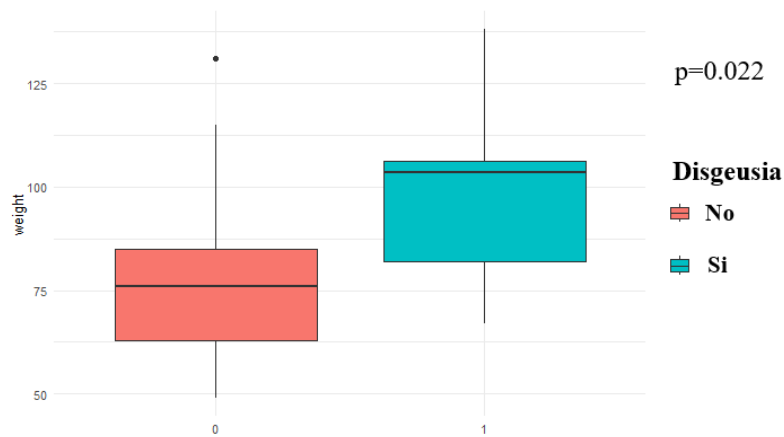


Figura 6. Associazione tra disgeusia e peso corporeo

Non venivano riscontrate altre associazioni significative considerando il genere, l'ECOG PS e il numero, la tipologia, la durata e il grado degli eventi avversi osservati.

Dal punto di vista farmacogenetico, si osservava una maggiore incidenza di mucosite orale nei pazienti portatori dei genotipi GT e TT del polimorfismo ABCB1 rs2032582 rispetto a quelli con genotipo GG (65.5% vs 34.5%, OR 5.32 IC 95% 1.56-20.67; $p=0.01$), con una maggiore durata dello stesso evento avverso nei pazienti con genotipo di riferimento (GG) per CYP3A4 rs2242480 (>4 mesi nel 66.7% vs ≤ 1 mese nel 100%; $p=0.002$).

Riscontravamo infine una maggiore incidenza di anoressia nei pazienti con genotipo CT e TT per il polimorfismo ABCB1 rs2235048 rispetto ai pazienti portatori del genotipo di riferimento (CC) (69.4% vs 30.6%; OR 6.82 IC 95% 1.68-35.5 $p=0.01$) (Fig.7). Per gli altri polimorfismi studiati, non sono state riscontrate ulteriori associazioni significative tipo di tossicità, numero, grado e durata degli eventi avversi.

Mucosite Orale				Mucosite orale				Anoressia				
Genotipo	Si	No	p	Genotipo	<1 m	1-4 m	>4 m	p	Genotipo	Si	No	p
ABCB1 rs2032582				CYP3A4 rs2242480					ABCB1 rs2235048			
GG	26.3%	73.7%	0.01	GG	5.6%	27.8%	66.7%	0.002	CC	25%	75%	0.01
GT+TT	65.5%	34.5%		GA+AA	100%	0%	0%		CT+TT	69.4%	30.6%	

Figura 7. Associazioni tra farmacogenetica ed eventi avversi

4.8 Determinanti clinici e farmacogenetici dell'outcome clinico

Per quanto riguarda l'outcome clinico abbiamo analizzato la sopravvivenza globale e libera da progressione di malattia, il tempo necessario ad ottenere la migliore risposta al trattamento e il tipo di “best response” radiologica raggiunta in rapporto alle caratteristiche cliniche e farmacogenetiche dei pazienti.

Dal punto di vista clinico, l'età all'inizio della terapia e l'ECOG PS risultavano significativamente associate alla sopravvivenza globale. In particolare, i pazienti con un'età alla diagnosi <70 anni presentavano una sopravvivenza mediana più lunga rispetto ai pazienti più anziani (mediana OS: NR vs 59.3 mesi [47.11-NA]; $p < 0.035$) (Fig.8) e allo stesso modo, i pazienti con un ECOG PS pari a 0 all'inizio del trattamento presentavano una migliore OS rispetto ai pazienti con ECOG PS 1-2 (mediana OS: NR vs 47.32 mesi [36.5-NA]; $p < 0.001$) (Fig.9)

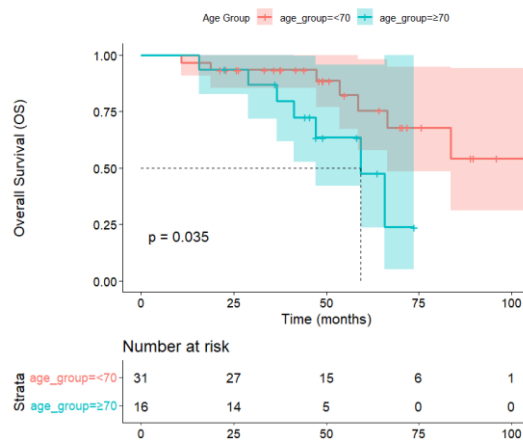


Figura 8. Analisi di sopravvivenza globale mediante curve di Kaplan–Meier e test di log-rank, stratificata per età all'inizio del trattamento.

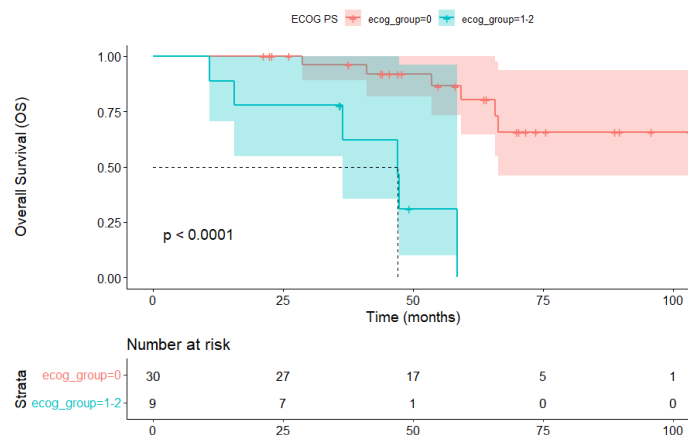


Figura 9. Analisi di sopravvivenza globale mediante curve di Kaplan–Meier e test di log-rank, stratificata per ECOG PS

Non sono emerse associazioni statisticamente significative tra la sopravvivenza globale (OS) e le altre caratteristiche cliniche considerate, quali il genere ($p=0.56$) e il peso corporeo ($p=0.6$).

Per quanto riguarda le caratteristiche istologiche, il confronto tra i pazienti con istotipo ben differenziato e quelli con istotipo scarsamente differenziato non ha evidenziato differenze significative in termini di OS (Fig. 10).

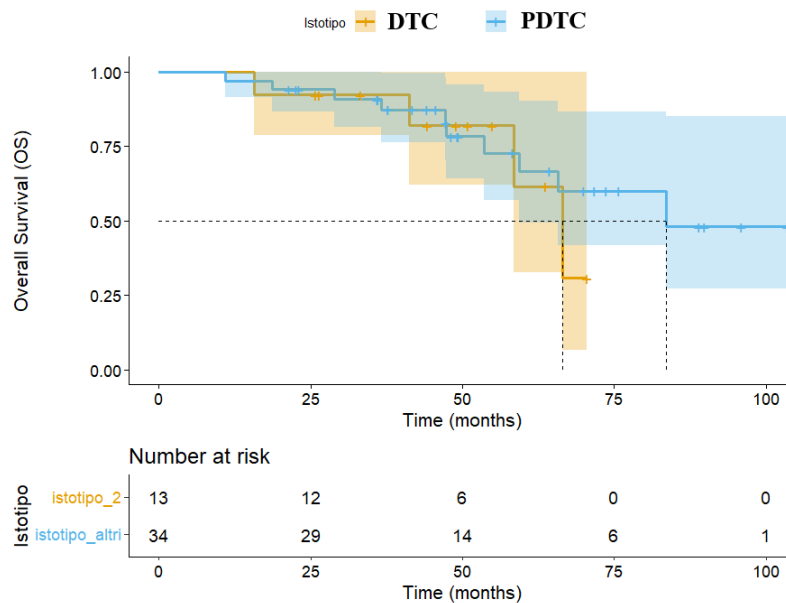


Figura 10. Analisi di sopravvivenza globale mediante curve di Kaplan–Meier e test di log-rank, stratificata per istotipo del tumore primitivo

Abbiamo infine preso in esame le caratteristiche molecolari del tumore primitivo e stratificato i pazienti in tre gruppi, in base all'alterazione molecolare presentata, come specificato nella sezione metodi: BRAF-like ($n=13$), RAS-like ($n=18$) e non nota ($n=17$) riscontrando una tendenza al limite della significatività statistica verso una sopravvivenza inferiore per i pazienti senza caratterizzazione molecolare ($p=0.06$; Fig. 11)

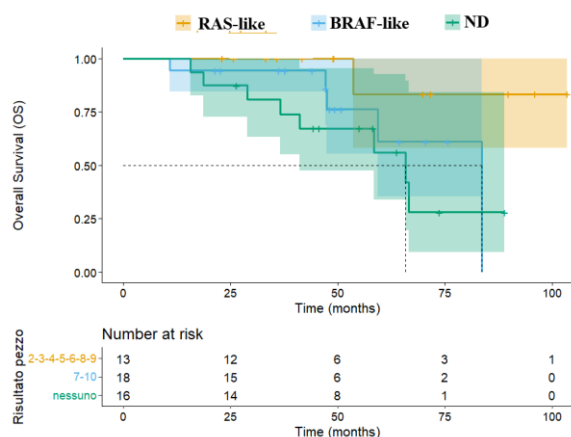


Figura 11. Analisi di sopravvivenza globale mediante curve di Kaplan–Meier e test di log-rank, stratificata per alterazione oncogenica driver riscontrata.

All’analisi multivariata, condotta mediante modello di regressione di Cox, che includeva l’età all’inizio del trattamento, l’ECOG PS, la presenza di alterazioni oncogeniche driver BRAF-like e l’istotipo, l’età maggiore (considerata come variabile continua) e un ECOG PS pari a 1–2 risultavano indipendentemente associati a una sopravvivenza globale peggiore (HR 1.05 IC 95%: 1.00-1.10; $p=0.04$ e HR 10.7 IC 95%: 2.72-42.2; $p<0.001$ rispettivamente). Nessuna associazione significativa veniva riscontrata tra le caratteristiche cliniche e la PFS, il tipo di best response e il tempo necessario ad ottenere la migliore risposta al trattamento. Allo stesso modo, nessuna associazione significativa veniva riscontrata tra il profilo farmacogenetico del paziente e gli outcome considerati.

5. Discussione

Le terapie con inibitori multichinasici rappresentano attualmente la prima linea di trattamento nei pazienti affetti da carcinoma tiroideo refrattario al radioiodio, localmente avanzato o metastatico a distanza. In particolare, il lenvatinib ha dimostrato sia nello studio registrativo di fase III SELECT che in pratica clinica, una significativa efficacia, soprattutto in termini di prolungamento del tempo di sopravvivenza libera da progressione di malattia [16, 41, 42, 47].

Tuttavia, tale beneficio si associa spesso a un'elevata incidenza di eventi avversi [16], che possono risultare prolungati nel tempo in considerazione della relativa lunga durata di tale trattamento. Alcune tossicità, come ad esempio l'ipertensione arteriosa o manifestazioni gastrointestinali come vomito, nausea o diarrea, risultano generalmente facilmente gestibili mediante un adeguato trattamento di supporto o l'impostazione di una terapia farmacologica specifica, mentre altre tossicità, come ad esempio l'anoressia, la fatigue o il calo ponderale presentano una gestione clinica più complessa e influenzano negativamente sia la qualità di vita del paziente, sia l'efficacia terapeutica, costringendo spesso ad una riduzione/sospensione della terapia. In particolare, nello studio registrativo, il 67,8% dei pazienti trattati con lenvatinib necessitavano di una interruzione temporanea del trattamento a causa della comparsa di eventi avversi, che conducevano a una sospensione definitiva della terapia nel 14,2% dei casi [16]. Ulteriore elemento di complessità è dovuto alla difficoltà nel predire prima dell'inizio del trattamento il tipo e il grado di tossicità che si verificherà nel paziente, e questo impone pertanto una stretta sorveglianza per tutta la durata della terapia. Queste osservazioni sottolineano come la gestione della tossicità terapeutica e l'individuazione di elementi in grado di predire la risposta alla terapia rappresentino un aspetto cruciale in questo contesto clinico.

Un punto di partenza volto alla personalizzazione della terapia e a limitare l'insorgenza di eventi avversi potrebbe consistere nell'individuazione del dosaggio terapeutico iniziale più appropriato per il singolo paziente. Attualmente, per il trattamento del carcinoma tiroideo avanzato ci si avvale infatti del dosaggio terapeutico standard di 24 mg/die per quanto riguarda la terapia con lenvatinib, che viene adattato solo in presenza di particolari condizioni cliniche associate ad un maggiore rischio di sviluppare complicanze, come l'età avanzata, aspetto evidenziato anche nella nostra coorte, oppure in presenza di un carcinoma localmente avanzato non operabile, o per lesioni metastatiche localizzate in prossimità di organi vitali o ancora in presenza di uno scadimento delle condizioni cliniche generali che renderebbe difficilmente tollerabile la terapia.

In tale ottica, un recente trial randomizzato [102] ha analizzato l'efficacia e la tolleranza al trattamento confrontando il dosaggio iniziale di 18 mg/die rispetto a quello standard di 24 mg/die, non riuscendo tuttavia a identificare un vantaggio significativo sia dal punto di vista della risposta al trattamento (non raggiunta la soglia di non inferiorità) che in termini di tossicità per il dosaggio inferiore, ma evidenziando comunque una PFS sovrapponibile per i due gruppi. Tale studio era principalmente orientato a valutare il tasso di risposta obiettiva al trattamento (ORR) a 24 settimane stratificando i pazienti oltre che per dosaggio terapeutico assunto, anche in base a parametri clinici quali età, ECOG PS, sesso, etnia e peso corporeo.

Risulterebbe tuttavia di grande interesse ampliare questa prospettiva, integrando anche il profilo genetico individuale del paziente che, in base ai dati disponibili in letteratura [81, 82], potrebbe essere coinvolto nel modificare la farmacocinetica e la biodisponibilità del farmaco e quindi potrebbe contribuire alla variabilità in termini di tossicità e di efficacia tra i pazienti a parità di dosaggio somministrato.

Nel nostro studio emerge come il dosaggio terapeutico iniziale di lenvatinib sia nella maggior parte dei casi (56.2%) di 24 mg/die, con un adattamento del dosaggio determinato principalmente dall'età del paziente ($\rho=-0.445$; $p=0.002$), in modo coerente con quanto osservato in altri studi in letteratura [47]. Solo una piccola parte dei pazienti iniziava invece con un dosaggio compreso tra 14 e 20 mg/die (31.3%) e inferiore a 14 mg/die (12.5%).

Nel corso del follow-up, tuttavia, la maggior parte dei pazienti in terapia con 24 mg/die ha richiesto una riduzione del dosaggio, principalmente a causa della comparsa di eventi avversi. Nella nostra analisi, il dosaggio terapeutico massimo tollerato è risultato positivamente e indipendentemente correlato con il peso corporeo ($\beta=0.093$, $p=0.019$). A tal proposito è interessante notare come, nell'impiego del lenvatinib per altre neoplasie — ad esempio nel carcinoma epatocellulare avanzato — il dosaggio venga effettivamente adattato in base al peso corporeo, secondo quanto riportato nella scheda tecnica (8 mg/die per pazienti con peso <60 kg vs 12 mg/die per peso ≥ 60 kg). Tale osservazione suggerisce quindi che questo parametro clinico possa influenzare in modo significativo la biodisponibilità del farmaco e che sicuramente merita di essere considerato all'inizio della terapia.

Dal punto di vista genetico, nel nostro studio non emerge un impatto significativo sul dosaggio terapeutico massimo tollerato da parte dei polimorfismi a carico dei geni codificanti per gli enzimi coinvolti nel metabolismo del lenvatinib e per le proteine di

trasporto. Tuttavia, questa analisi è molto limitata dal disegno retrospettivo dello studio che non ha permesso di valutare la reale concentrazione plasmatica del farmaco in rapporto al dosaggio somministrato.

In letteratura è stato evidenziato come l'assetto genetico del paziente a livello di questi geni possa influenzare significativamente la biodisponibilità plasmatica del farmaco [81, 82]. In particolare, nello studio di Ozeki, i soggetti con polimorfismo del gene CYP3A4 rs2242480, in eterozigosi o in omozigosi presentavano concentrazioni plasmatiche di lenvatinib significativamente minori rispetto alla sequenza di riferimento (4.77 vs 6.34 ng/ml/mg; $p=0.018$) mentre al contrario, pazienti portatori in eterozigosi o in omozigosi del polimorfismo di ABCB1 rs1045642, presentavano concentrazioni plasmatiche tendenzialmente maggiori, senza tuttavia raggiungere la significatività statistica (6.02 vs 4.9 ng/ml/mg; $p=0.72$) [81].

Va inoltre considerato che la sola valutazione della biodisponibilità plasmatica potrebbe comunque rappresentare una semplificazione eccessiva, in quanto i trasportatori ABC regolano oltre che l'assorbimento del farmaco a livello intestinale e la sua eliminazione a livello biliare, anche il trasporto a livello dei tessuti sani e tumorali [103, 104]. Di conseguenza, differenti assetti genetici potrebbero contribuire a determinare una variabilità interindividuale in termini di tossicità e di efficacia terapeutica, anche in assenza di un impatto significativo sulla biodisponibilità plasmatica del farmaco attivo.

Nella nostra coorte registravamo una maggiore incidenza di mucosite orale nei pazienti portatori dei genotipi GT e TT del polimorfismo ABCB1 rs2032582 rispetto a quelli con genotipo di riferimento GG (65.5% vs 26.3%, $p=0.01$), con una maggiore durata dello stesso evento avverso nei pazienti con sequenza di riferimento per CYP3A4 rs2242480 (>4 mesi nel 66.7% vs <1 mese nel 100%; $p=0.002$). In assenza di dati sul dosaggio plasmatico del lenvatinib, si può ipotizzare che questa maggiore tossicità potrebbe essere legata in parte ad una maggiore biodisponibilità plasmatica del farmaco, dovuta da una minore efficienza da parte del trasportatore ABCB1 nel determinare l'efflusso di farmaco attivo a livello intestinale e da una minore capacità metabolica della sequenza di riferimento del CYP3A4 rispetto alle sue varianti come osservato per altri farmaci [83]. Tuttavia, non si può escludere che un differente funzionamento del trasportatore ABC a livello della mucosa orale contribuisca a una diversa distribuzione tissutale del farmaco e di conseguenza alla comparsa di mucosite.

Nella nostra coorte riscontravamo inoltre una maggiore incidenza di anoressia nei pazienti portatori con genotipo CT e TT per il polimorfismo ABCB1 rs2235048 rispetto ai pazienti portatori del genotipo di riferimento (CC) (69.4% vs 25%; $p=0.01$). Tale evento avverso è stato precedentemente associato, in uno studio condotto su pazienti in terapia con lenvatinib, a concentrazioni plasmatiche più elevate di farmaco attivo [82]. Anche in questo caso è possibile ipotizzare quindi che i pazienti portatori di tale polimorfismo, presentino una maggiore esposizione sistemica al farmaco, a parità di dosaggio assunto, verosimilmente in relazione ad una minore attività di efflusso da parte delle varianti del trasportatore ABCB1. La presenza di questi assetti genetici potrebbe quindi suggerire la necessità di un aggiustamento del dosaggio terapeutico prima di intraprendere la terapia o comunque un monitoraggio ambulatoriale più stretto, in modo da limitare l'impatto negativo sulla qualità di vita e sulle condizioni di salute generali del paziente.

Dal punto di vista clinico, dai nostri dati è emersa un'associazione positiva tra lo sviluppo di disgeusia e il peso corporeo, con i pazienti che presentavano tale evento avverso caratterizzati da un peso mediano significativamente più elevato (103.5 kg vs 76.0 kg; $p=0.022$). Tuttavia, il basso numero di pazienti della nostra coorte che ha sviluppato disgeusia ($n=5$) potrebbe aver influenzato l'affidabilità statistica dell'analisi, suggerendo la possibilità di un'associazione casuale. In letteratura, inoltre, non sono attualmente disponibili dati che confermino o escludano tale relazione, che andrebbe pertanto approfondita in studi su coorti più ampie, considerata la bassa incidenza.

Sempre dal punto di vista clinico, i pazienti con un'età più avanzata (≥ 65 anni) presentavano una maggiore incidenza di fatigue (84.8% vs 53.3%, $p=0.04$), e questo risulta essere un ulteriore aspetto di cui tenere conto in corso di terapia con lenvatinib. Tale evento avverso è risultato essere, assieme all'ipertensione arteriosa, il più frequente nella nostra coorte (75% dei pazienti) con percentuali simili a quelle riscontrate nello studio SELECT (59%) [16], e determina un impatto molto importante sulla qualità di vita del paziente. Allo stesso tempo risulta molto difficile da trattare, soprattutto perché non sono disponibili delle terapie farmacologiche mirate e per via della genesi multifattoriale alla base, tra cui la riduzione dell'attività fisica, la sarcopenia che può essere legata alla terapia stessa o alla progressione tumorale [105, 106] o ancora problematiche dal punto di vista psicologico. Questo dato pone l'accento sull'importanza delle strategie di prehabilitation, da mettere in atto già prima di iniziare il trattamento [107, 108], con particolare attenzione per i pazienti con età più

avanzata che potrebbero trarre il maggior beneficio da tali interventi, conservando un performance status migliore durante il trattamento.

Lo stato di salute generale del paziente con patologia neoplastica risulta essere infatti uno dei fattori cruciali in grado di incidere sulla sopravvivenza globale e sulla risposta al trattamento, come evidenziato dalle analisi post-hoc dello studio SELECT [42-44]. Analogamente, anche nella nostra coorte i pazienti con ECOG PS 1-2 presentavano una OS mediana nettamente peggiore rispetto ai pazienti con ECOG PS 0 (3.9 anni vs NR [3-NA]; $p < 0.001$) e tale fattore risultava, assieme all'età di inizio del trattamento, indipendentemente associato alla sopravvivenza all'analisi multivariata.

Tali dati potrebbero riflettere sia la presenza di un maggiore volume di malattia nei pazienti più anziani, sia migliori condizioni generali nei pazienti più giovani, in grado di tollerare pertanto un dosaggio terapeutico più elevato sin dall'inizio del trattamento ed ottenere quindi un migliore outcome terapeutico. Queste evidenze suggeriscono come possa essere più vantaggioso intraprendere la terapia sistemica con lenvatinib in una fase più precoce di malattia, prima della comparsa di sintomatologia specifica e del deterioramento delle condizioni cliniche generali del paziente.

Il nostro studio fornisce inoltre informazioni sull'efficacia terapeutica del lenvatinib in termini di OS in rapporto all'istotipo tumorale e alle alterazioni oncogeniche driver. Tale aspetto risulta ancora poco esplorato in letteratura, con evidenze provenienti principalmente da analisi post-hoc dello studio registrativo SELECT [42] o da studi retrospettivi in pazienti trattati anche con altri inibitori tirosino-chinasici [52, 109]. Nella nostra coorte non sono emerse differenze significative in termini di sopravvivenza globale tra i pazienti con istotipo differenziato e quelli con istotipo scarsamente differenziato, nonostante sia ben documentato in letteratura l'impatto prognostico sfavorevole di un'istologia tumorale più aggressiva, [2, 110-112] confermando l'efficacia della terapia con lenvatinib anche in presenza di carcinomi più aggressivi. Non sono emerse differenze significative in termini di sopravvivenza globale nemmeno in relazione alle alterazioni oncogeniche driver presenti, probabilmente per effetto dell'attività di inibizione multichinasica del lenvatinib, in grado di agire simultaneamente su diverse vie di segnalazione oncogenica ed esercitare in questo modo un'azione antitumorale efficace su molteplici target molecolari.

Complessivamente i dati emersi dal nostro studio contribuiscono a definire l'impatto dei fattori clinici e genetici sul profilo di tossicità e sull'outcome terapeutico del lenvatinib nei pazienti con carcinoma tiroideo avanzato, nonostante le limitazioni dovute al disegno

retrospettivo, alla dimensione ridotta del campione, legata principalmente alla rarità di tale condizione clinica e all'assenza della misurazione delle concentrazioni plasmatiche del lenvatinib, analisi che verrà comunque eseguita in un successivo studio prospettico e che consentirà di chiarire appieno la relazione tra dosaggio somministrato, assetto genetico e biodisponibilità del farmaco.

Il nostro studio risulta inoltre uno dei pochi in letteratura ad aver indagato la relazione tra farmacogenetica del lenvatinib, tossicità e risposta alla terapia. Tra i punti di forza inoltre bisogna considerare sicuramente il disegno multicentrico che ha coinvolto tre centri Italiani di terzo livello per il trattamento del carcinoma tiroideo avanzato, che garantisce una buona rappresentatività della popolazione in studio. Inoltre, la completezza dei dati clinici raccolti ha consentito un'analisi accurata e integrata, comprendente le informazioni relative al dosaggio terapeutico, alla tipologia e al grado degli eventi avversi, nonché alla risposta radiologica al trattamento e agli esiti in termini di OS e PFS.

6. Conclusioni

La terapia con lenvatinib rappresenta ad oggi la prima linea terapeutica nei pazienti con carcinoma tiroideo differenziato, refrattario al radioiodio, e localmente avanzato o metastatico a distanza in progressione ed è in grado di garantire in tale contesto clinico una prolungata sopravvivenza globale e libera da progressione di malattia, al prezzo di una significativa tossicità sistemica e una riduzione della qualità di vita.

Risulta quindi fondamentale per il clinico adattare fin dall'inizio del trattamento il dosaggio terapeutico somministrato, in modo da ridurre al minimo l'insorgenza di tossicità e la necessità di riduzione/sospensione della terapia, massimizzando il beneficio terapeutico. A tale scopo risulta fondamentale considerare in primo luogo le caratteristiche del paziente, che potrebbero predire la comparsa di specifiche tossicità e soprattutto la prognosi. Accanto a tali informazioni, in previsione di intraprendere il trattamento sistemico, potrebbe essere utile inoltre considerare il profilo farmacogenetico del paziente, che potrebbe rappresentare un ulteriore strumento per predire la tossicità relata alla terapia e personalizzare la somministrazione del lenvatinib in base alla biodisponibilità sistemica.

7. Bibliografia

1. Ringel MD, Sosa JA, Baloch Z, et al. 2025 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid*. 2025;35(8):841-985
2. Durante C, Haddy N, Baudin E, et al. Long-term outcome of 444 patients with distant metastases from papillary and follicular thyroid carcinoma: benefits and limits of radioiodine therapy. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(8):2892-2899
3. Segal K, Shpitzer T, Hazan A, et al. Invasive well-differentiated thyroid carcinoma: effect of treatment modalities on outcome. *Otolaryngol Head Neck Surg* (2006) 134(5):819–22
4. Wang LY, Nixon IJ, Patel SG, et al. Operative management of locally advanced, differentiated thyroid cancer. *Surgery* (2016) 160(3):738–46
5. Nixon IJ, Witcher MM, Palmer FL, et al. The impact of distant metastases at presentation on prognosis in patients with differentiated carcinoma of the thyroid gland. *Thyroid*. 2012;22(9):884-889
6. Robbins RJ, Schlumberger MJ 2005 The evolving role of ¹³¹I for the treatment, of differentiated thyroid carcinoma. *J Nucl Med* 46:28S–37S
7. Schlumberger M, Brose M, Elisei R, et al. Definition and management of radioactive iodine-refractory differentiated thyroid cancer. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2014;2(5):356-358
8. S.W. Bayles, T.T. Kingdom, G.W. Carlson, Management of thyroid carcinoma invading the aerodigestive tract. *Laryngoscope* 108(9), 1402–1407 (1998)
9. J. Honings, A.E. Stephen, H.A. Marres, H.A. Gaissert, The management of thyroid carcinoma invading the larynx or trachea. *Laryngoscope* 120(4), 682–689 (2010)
10. Lamartina L, Godbert Y, Nascimento C, et al. Locally unresectable differentiated thyroid cancer: outcomes and perspectives. *Endocrine*. 2020;69(1):133-141
11. Sherman SI. Cytotoxic chemotherapy for differentiated thyroid carcinoma. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* (2010) 22(6):464–8
12. Landa I, Cabanillas ME. Genomic alterations in thyroid cancer: biological and clinical insights. *Nat Rev Endocrinol*. 2024;20(2):93-110
13. Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma. *Cell*. 2014;159(3):676-690
14. Valerio L, Pieruzzi L, Giani C, et al. Targeted Therapy in Thyroid Cancer: State of the Art. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2017;29(5):316-324
15. Brose MS, Nutting CM, Jarzab B, et al. Sorafenib in radioactive iodine-refractory, locally advanced or metastatic differentiated thyroid cancer: a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet* (2014) 384(9940):319–28
16. Schlumberger M, Tahara M, Wirth LJ, et al. Lenvatinib versus placebo in radioiodine-refractory thyroid cancer. *N Engl J Med* (2015) 372(7):621–30
17. Brose MS, Robinson B, Sherman SI, et al. Cabozantinib for radioiodine-refractory differentiated thyroid cancer (COSMIC-311): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2021;22(8):1126-1138
18. Zhang Y, Xing Z, Liu T, et al. Targeted therapy and drug resistance in thyroid cancer. *Eur J Med Chem*. 2022;238:114500
19. Jeon Y, Park S, Lee SH, et al. Combination of Dabrafenib and Trametinib in Patients with Metastatic BRAFV600E-Mutated Thyroid Cancer. *Cancer Res Treat*. 2024;56(4):1270-1276

20. Wirth LJ, Brose MS, Subbiah V, et al. Durability of Response With Selpercatinib in Patients With RET-Activated Thyroid Cancer: Long-Term Safety and Efficacy From LIBRETTO-001. *J Clin Oncol.* 2024;42(27):3187-3195
21. Waguespack SG, Drilon A, Lin JJ, et al. Efficacy and safety of larotrectinib in patients with TRK fusion-positive thyroid carcinoma. *Eur J Endocrinol.* 2022;186(6):631-643. Published 2022 Apr 29
22. Leboulleux S, Do Cao C, Zerdoud S, et al. A Phase II Redifferentiation Trial with Dabrafenib-Trametinib and 131I in Metastatic Radioactive Iodine Refractory BRAF p.V600E-Mutated Differentiated Thyroid Cancer. *Clin Cancer Res.* 2023;29(13):2401-2409
23. Leboulleux S, Benisvy D, Taieb D, et al. MERAIODE: A Phase II Redifferentiation Trial with Trametinib and 131I in Metastatic Radioactive Iodine Refractory RAS Mutated Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid.* 2023;33(9):1124-1129
24. Groussin L, Theodon H, Bessiène L, et al. Redifferentiating Effect of Larotrectinib in NTRK-Rearranged Advanced Radioactive-Iodine Refractory Thyroid Cancer. *Thyroid.* 2022;32(5):594-598
25. Weiler D, Pérez Lago MDS. Successful radioiodine redifferentiation with selpercatinib in RET fusion-positive papillary thyroid carcinoma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2024;51(11):3467-3468
26. 925MO Regomune study: A phase II study of regorafenib + avelumab in solid tumors. Results of the radioiodine-refractory differentiated thyroid cancer (RR-DTC) Godbert, Y. et al. *Annals of Oncology*, Volume 35, S1120
27. Deandreis D, Al Ghuzlan A, Leboulleux S, et al. Do histological, immunohistochemical and metabolic (radioiodine and fluorodeoxyglucose uptake) patterns of metastatic thyroid cancer correlate with patient outcome? *Endocr Relat Cancer* 2011; 18: 159–69
28. Shoup M, Stojadinovic A, Nissan A, et al. Prognostic indicators of outcomes in patients with distant metastases from differentiated thyroid carcinoma. *J Am Coll Surg.* 2003;197(2):191-197
29. Ito Y, Miyauchi A, Ito M, et al. Prognosis and prognostic factors of differentiated thyroid carcinoma after the appearance of metastasis refractory to radioactive iodine therapy. *Endocr J.* 2014;61(8):821-824
30. Hirsch D, Levy S, Tsvetov G, et al. LONG-TERM OUTCOMES AND PROGNOSTIC FACTORS IN PATIENTS WITH DIFFERENTIATED THYROID CANCER AND DISTANT METASTASES. *Endocr Pract.* 2017;23(10):1193-1200
31. Toraih EA, Hussein MH, Zerfaoui M, et al. Site-Specific Metastasis and Survival in Papillary Thyroid Cancer: The Importance of Brain and Multi-Organ Disease. *Cancers (Basel).* 2021;13(7):1625. Published 2021 Apr 1
32. Sohn SY, Kim HI, Kim YN, Kim TH, Kim SW, Chung JH. Prognostic indicators of outcomes in patients with lung metastases from differentiated thyroid carcinoma during long-term follow-up. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2018;88(2):318-326
33. Nunes KS, Matos LL, Cavalheiro BG, et al. Risk factors associated with disease-specific mortality in papillary thyroid cancer patients with distant metastases. *Endocrine.* 2022;75(3):814-822.
34. Ito Y, Onoda N, Kihara M, Miya A, Miyauchi A. Prognostic Significance of Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio in Differentiated Thyroid Carcinoma Having Distant Metastasis: A Comparison With Thyroglobulin-doubling Rate and Tumor Volume-doubling Rate. *In Vivo.* 2021;35(2):1125-1132

35. Fogli S, Porta C, Del Re M, et al. Optimizing treatment of renal cell carcinoma with VEGFR-TKIs: a comparison of clinical pharmacology and drug-drug interactions of anti-angiogenic drugs. *Cancer Treat Rev.* 2020;84:101966
36. Yamamoto Y, Matsui J, Matsushima T, Obaishi H, Miyazaki K, Nakamura K, Tohyama O, Semba T, Yamaguchi A, Hoshi SS, Mimura F, Haneda T, Fukuda Y, Kamata JI, Takahashi K, Matsukura M, Wakabayashi T, Asada M, Nomoto KI, Watanabe T, Dezso Z, Yoshimatsu K, Funahashi Y, Tsuruoka A. Lenvatinib, an angiogenesis inhibitor targeting VEGFR/FGFR, shows broad antitumor activity in human tumor xenograft models associated with microvessel density and pericyte coverage. *Vasc Cell.* 2014 Sep 6;6:18
37. Matsui, J., Funahashi, Y., Uenaka, T., Watanabe, T., Tsuruoka, A., Asada, M., 2008b. Multi-kinase inhibitor E7080 suppresses lymph node and lung metastases of human mammary breast tumor MDA-MB-231 via inhibition of vascular endothelial growth factor-receptor (VEGF-R) 2 and VEGF-R3 kinase. *Clin. Cancer Res.* 14, 5459–5465
38. Wang S, Wang Y, Yu J, Wu H, Zhou Y. Lenvatinib as First-Line Treatment for Unresectable Hepatocellular Carcinoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cancers (Basel).* 2022 Nov 10;14(22):5525
39. Panian J, Zhong C, Choi SH, et al. Efficacy of Treatments After Lenvatinib in Patients with Advanced Renal Cell Carcinoma. *Eur Urol Focus.* 2025;11(2):279-286
40. Marth C, Moore RG, Bidziński M, et al. First-Line Lenvatinib Plus Pembrolizumab Versus Chemotherapy for Advanced Endometrial Cancer: A Randomized, Open-Label, Phase III Trial. *J Clin Oncol.* 2025;43(9):1083-1100
41. Brose MS, Worden FP, Newbold KL, Guo M, Hurria A. Effect of Age on the Efficacy and Safety of Lenvatinib in Radioiodine-Refractory Differentiated Thyroid Cancer in the Phase III SELECT Trial. *J Clin Oncol.* 2017;35(23):2692-2699
42. Kiyota N, Tahara M, Robinson B, et al. Impact of baseline tumor burden on overall survival in patients with radioiodine-refractory differentiated thyroid cancer treated with lenvatinib in the SELECT global phase 3 trial. *Cancer.* 2022;128(12):2281-2287
43. Tahara M, Kiyota N, Hoff AO, et al. Impact of lung metastases on overall survival in the phase 3 SELECT study of lenvatinib in patients with radioiodine-refractory differentiated thyroid cancer. *Eur J Cancer.* 2021;147:51-57
44. Taylor MH, Takahashi S, Capdevila J, et al. Correlation of Performance Status and Neutrophil-Lymphocyte Ratio with Efficacy in Radioiodine-Refractory Differentiated Thyroid Cancer Treated with Lenvatinib. *Thyroid.* 2021;31(8):1226-1234
45. Worden F, Rajkovic-Hooley O, Reynolds N, Milligan G, Zhang J. Real-world treatment patterns and clinical outcomes in patients with radioiodine-refractory differentiated thyroid cancer (RAI-R DTC) treated with first line lenvatinib monotherapy in the United States. *Endocrine.* 2024;84(2):663-669
46. Onaga R, Enokida T, Tanaka N, et al. Long-Term Clinical Outcomes of Patients with Differentiated Thyroid Cancer Treated with Lenvatinib: Results from Real-World Practice in Japan. *Thyroid.* 2025;35(7):781-788
47. Locati LD, Piovesan A, Durante C, et al. Real-world efficacy and safety of lenvatinib: data from a compassionate use in the treatment of radioactive iodine-refractory differentiated thyroid cancer patients in Italy. *Eur J Cancer.* 2019;118:35-40
48. el-Hag A, Clark RA. Immunosuppression by activated human neutrophils. Dependence on the myeloperoxidase system. *J Immunol.* 1987;139(7):2406-2413
49. Petrie HT, Klassen LW, Kay HD. Inhibition of human cytotoxic T lymphocyte activity in vitro by autologous peripheral blood granulocytes. *J Immunol.* 1985;134(1):230-234

50. Puliani G, Bianchini M, Giani C, et al. Gender impact on safety and efficacy in lenvatinib treated patients with radioiodine-refractory differentiated thyroid cancer (GISEL study). *Eur Thyroid J.* 2025;14(2):e240386. Published 2025 Apr 23
51. Sabra MM, Sherman E, Tuttle RM. Prolongation of tumour volume doubling time (midDT) is associated with improvement in disease-specific survival in patients with rapidly progressive radioactive iodine refractory differentiated thyroid cancer selected for molecular targeted therapy. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2019;90(4):617-622
52. Capdevila J, Matos I, Mancuso FM, et al. Identification of Expression Profiles Defining Distinct Prognostic Subsets of Radioactive-Iodine Refractory Differentiated Thyroid Cancer from the DECISION Trial. *Mol Cancer Ther.* 2020;19(1):312-317
53. Inukai Y, Yamamoto K, Honda T, et al. Differences in the Intestinal Microbiome Associated with Diarrhea during Lenvatinib Treatment for Hepatocellular Carcinoma. *Dig Dis.* 2023;41(1):138-147
54. Fogli S, Gianfilippo G, Cucchiara F, et al. Clinical pharmacology and drug-drug interactions of lenvatinib in thyroid cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2021;163:103366
55. Dubbelman, A.C., Rosing, H., Thijssen, B., Gebretensae, A., Lucas, L., Chen, H., et al 2012. Development and validation of LC-MS/MS assays for the quantification of E7080 and metabolites in various human biological matrices. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 887-888, 25–34
56. Yamada K, Yamamoto N, Yamada Y, et al. Phase I dose-escalation study and biomarker analysis of E7080 in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res.* 2011;17(8):2528-2537
57. Hong, D.S., Kurzrock, R., Wheler, J.J., Naing, A., Falchook, G.S., Fu, S., et al., 2015 Phase I dose-escalation study of the multikinase inhibitor lenvatinib in patients with advanced solid tumors and in an expanded cohort of patients with melanoma. *Clin. Cancer Res.* 21, 4801–4810
58. Boss, D.S., Glen, H., Beijnen, J.H., Keesen, M., Morrison, R., Tait, B., et al., 2012. A phase I study of E7080, a multitargeted tyrosine kinase inhibitor, in patients with advanced solid tumours. *Br. J. Cancer* 106, 1598–1604
59. Nakamichi, S., Nokihara, H., Yamamoto, N., Yamada, Y., Honda, K., Tamura, Y., et al., 2015. A phase 1 study of lenvatinib, multiple receptor tyrosine kinase inhibitor, in Japanese patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 76, 1153–1161
60. Dubbelman, A.C., Rosing, H., Nijenhuis, C., Huitema, A.D., Mergui-Roelvink, M., Gupta, A., et al., 2015. Pharmacokinetics and excretion of (14)C-lenvatinib in patients with advanced solid tumors or lymphomas. *Invest. New Drugs* 33, 233–240
61. Dubbelman AC, Nijenhuis CM, Jansen RS, et al. Metabolite profiling of the multiple tyrosine kinase inhibitor lenvatinib: a cross-species comparison. *Invest New Drugs.* 2016;34(3):300-318
62. De Mattia, E., Cecchin, E., Guardascione, M., Foltran, L., Di Raimo, T., Angelini, F., et al., 2019. Pharmacogenetics of the systemic treatment in advanced hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.* 25, 3870–3896
63. Prescribing information Woodcliff Lake, NJ: Eisai Inc., 2015
64. Vavrová K, Indra R, Pompach P, Heger Z, Hodek P. The impact of individual human cytochrome P450 enzymes on oxidative metabolism of anticancer drug lenvatinib. *Biomed Pharmacother.* 2022;145:112391

65. Shumaker, R.C., Aluri, J., Fan, J., Martinez, G., Thompson, G.A., Ren, M., 2014b. Effect of rifampicin on the pharmacokinetics of lenvatinib in healthy adults. *Clin. Drug Investig.* 34, 651–659
66. Shumaker, R., Aluri, J., Fan, J., Martinez, G., Thompson, G.A., Ren, M., 2015b. Effects of ketoconazole on the pharmacokinetics of lenvatinib (E7080) in healthy participants. *Clin. Pharmacol. Drug Dev.* 4, 155–160
67. Li J, Bluth MH. Pharmacogenomics of drug metabolizing enzymes and transporters: implications for cancer therapy. *Pharmgenomics Pers Med.* 2011;4:11-33
68. Kerb R. Implications of genetic polymorphisms in drug transporters for pharmacotherapy. *Cancer Lett.* 2006;234(1):4-33
69. Gupta A, Jarzab B, Capdevila J, Shumaker R, Hussein Z. Population pharmacokinetic analysis of lenvatinib in healthy subjects and patients with cancer. *Br J Clin Pharmacol.* 2016;81(6):1124-1133
70. Relling MV, Evans WE. Pharmacogenomics in the clinic. *Nature.* 2015 Oct 15;526(7573):343-50
71. Zhou Y, Lauschke VM. The genetic landscape of major drug metabolizing cytochrome P450 genes-an updated analysis of population-scale sequencing data. *Pharmacogenomics J.* 2022;22(5-6):284-293
72. Gao S, Bell EC, Zhang Y, Liang D. Racial Disparity in Drug Disposition in the Digestive Tract. *Int J Mol Sci.* 2021;22(3):1038. Published 2021 Jan 21
73. Karki R, Pandya D, Elston RC, Ferlini C. Defining "mutation" and "polymorphism" in the era of personal genomics. *BMC Med Genomics.* 2015;8:37. Published 2015 Jul 15
74. Brookes AJ. The essence of SNPs. *Gene.* 1999;234(2):177-186
75. Koopmans AB, Braakman MH, Vinkers DJ, Hoek HW, van Harten PN. Meta-analysis of probability estimates of worldwide variation of CYP2D6 and CYP2C19. *Transl Psychiatry.* 2021;11(1):141. Published 2021 Feb 24
76. Alghamdi A, Seay S, Hooper DK, et al. Tacrolimus pharmacokinetics are influenced by CYP3A5, age, and concomitant fluconazole in pediatric kidney transplant patients. *Clin Transl Sci.* 2023;16(10):1768-1778
77. Brunet M, van Gelder T, Åsberg A, et al. Therapeutic Drug Monitoring of Tacrolimus-Personalized Therapy: Second Consensus Report. *Ther Drug Monit.* 2019;41(3):261-307
78. Province MA, Altman RB, Klein TE. Interpreting the CYP2D6 results from the International Tamoxifen Pharmacogenetics Consortium. *Clin Pharmacol Ther.* 2014;96(2):144-146
79. Brauch H, Schroth W, Goetz MP, et al. Tamoxifen use in postmenopausal breast cancer: CYP2D6 matters. *J Clin Oncol.* 2013;31(2):176-180
80. Crews KR, Gaedigk A, Dunnenberger HM, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for cytochrome P450 2D6 genotype and codeine therapy: 2014 update. *Clin Pharmacol Ther.* 2014;95(4):376-382
81. Ozeki T, Nagahama M, Fujita K, et al. Influence of CYP3A4/5 and ABC transporter polymorphisms on lenvatinib plasma trough concentrations in Japanese patients with thyroid cancer. *Sci Rep.* 2019;9(1):5404. Published 2019 Apr 1
82. Okubo H, Ando H, Ishizuka K, et al. Impact of genetic polymorphisms on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of lenvatinib in patients with hepatocellular carcinoma. *J Pharmacol Sci.* 2022;148(1):6-13
83. Yang W, Zhao D, Han S, et al. CYP3A4*1G regulates CYP3A4 intron 10 enhancer and promoter activity in an allelic-dependent manner. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2015;53(8):647-657

84. Miura M, Satoh S, Kagaya H, et al. Impact of the CYP3A4*1G polymorphism and its combination with CYP3A5 genotypes on tacrolimus pharmacokinetics in renal transplant patients. *Pharmacogenomics*. 2011;12(7):977-984
85. Li J, Wang X, Ning C, et al. Influences of ABC transporter and CYP3A4/5 genetic polymorphisms on the pharmacokinetics of lenvatinib in Chinese healthy subjects. *Eur J Clin Pharmacol*. 2020;76(8):1125-1133
86. 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(4):383-391
87. Pilotto Heming C, Muriithi W, Wanjiku Macharia L, Niemeyer Filho P, Moura-Neto V, Aran V. P-glycoprotein and cancer: what do we currently know? *Heliyon*. 2022 Oct 22;8(10):e11171
88. Schaich M, Kestel L, Pfirrmann M, et al. A MDR1 (ABCB1) gene single nucleotide polymorphism predicts outcome of temozolomide treatment in glioblastoma patients. *Ann Oncol*. 2009;20(1):175-181
89. Li J, Bluth MH. Pharmacogenomics of drug metabolizing enzymes and transporters: implications for cancer therapy. *Pharmgenomics Pers Med*. 2011;4:11-33
90. Ieiri I, Takane H, Otsubo K. The MDR1 (ABCB1) gene polymorphism and its clinical implications. *Clin Pharmacokinet*. 2004;43:553-576
91. Cascorbi I, Gerloff T, Johne A, et al. Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in white subjects. *Clin Pharmacol Ther*. 2001;69(3):169-174
92. Wu L, Xu X, Shen J, et al. MDR1 gene polymorphisms and risk of recurrence in patients with hepatocellular carcinoma after liver transplantation. *J Surg Oncol*. 2007;96(1):62-68
93. Wang D, Johnson AD, Papp AC, Kroetz DL, Sadée W. Multidrug resistance polypeptide 1 (MDR1, ABCB1) variant 3435C>T affects mRNA stability. *Pharmacogenet Genomics*. 2005;15(10):693-704
94. Chang H, Rha SY, Jeung HC, et al. Association of the ABCB1 gene polymorphisms 2677G>T/A and 3435C>T with clinical outcomes of paclitaxel monotherapy in metastatic breast cancer patients. *Ann Oncol*. 2009;20(2):272-277
95. Min DI, Ellingrod VL. C3435T mutation in exon 26 of the human MDR1 gene and cyclosporine pharmacokinetics in healthy subjects. *Ther Drug Monit*. 2002;24(3):400-404
96. Chowbay B, Li H, David M, Cheung YB, Lee EJ. Meta-analysis of the influence of MDR1 C3435T polymorphism on digoxin pharmacokinetics and MDR1 gene expression. *Br J Clin Pharmacol*. 2005;60(2):159-171
97. Dulucq S, Krajinovic M. The pharmacogenetics of imatinib. *Genome Med*. 2010;2(11):85. Published 2010 Nov 30
98. Hsin CH, Stoffel MS, Gazzaz M, et al. Combinations of common SNPs of the transporter gene ABCB1 influence apparent bioavailability, but not renal elimination of oral digoxin. *Sci Rep*. 2020;10(1):12457. Published 2020 Jul 27
99. 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(2):469-479
100. Dalle Fratte C, Polesel J, Gagno S, et al. Impact of ABCG2 and ABCB1 Polymorphisms on Imatinib Plasmatic Exposure: An Original Work and Meta-Analysis. *Int J Mol Sci*. 2023;24(4):3303. Published 2023 Feb 7

101. Li J, Cusatis G, Brahmer J, et al. Association of variant ABCG2 and the pharmacokinetics of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in cancer patients. *Cancer Biol Ther.* 2007;6(3):432-438
102. Brose MS, Panaseykin Y, Konda B, et al. A Randomized Study of Lenvatinib 18 mg vs 24 mg in Patients With Radioiodine-Refractory Differentiated Thyroid Cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 2022;107(3):776-787
103. Wang Y, Tu MJ, Yu AM. Efflux ABC transporters in drug disposition and their posttranscriptional gene regulation by microRNAs. *Front Pharmacol.* 2024;15:1423416. Published 2024 Jul 24
104. Brinkmann U, Eichelbaum M. Polymorphisms in the ABC drug transporter gene MDR1. *Pharmacogenomics J.* 2001;1(1):59-64
105. Cabanillas ME, Takahashi S. Managing the adverse events associated with lenvatinib therapy in radioiodine-refractory differentiated thyroid cancer. *Semin Oncol.* 2019;46(1):57-64
106. Rinninella E, Cintoni M, Raoul P, et al. Skeletal Muscle Loss during Multikinase Inhibitors Therapy: Molecular Pathways, Clinical Implications, and Nutritional Challenges. *Nutrients.* 2020;12(10):3101. Published 2020 Oct 12
107. Jack S, Andritsch E, Joaquim A, et al. Current landscape and support for practical initiation of oncological prehabilitation translatable to thyroid cancer: A position paper. *Heliyon.* 2024;10(10):e30723. Published 2024 May 11
108. Silver JK, Baima J. Cancer prehabilitation: an opportunity to decrease treatment-related morbidity, increase cancer treatment options, and improve physical and psychological health outcomes. *Am J Phys Med Rehabil.* 2013;92(8):715-727
109. De la Fouchardiere C, Oussaid N, Derbel O, et al. Does Molecular Genotype Provide Useful Information in the Management of Radioiodine Refractory Thyroid Cancers? Results of a Retrospective Study. *Target Oncol.* 2016;11(1):71-82
110. Schlumberger M, Challeton C, De Vathaire F, et al. Radioactive iodine treatment and external radiotherapy for lung and bone metastases from thyroid carcinoma. *J Nucl Med.* 1996;37(4):598-605
111. Saïe C, Wassermann J, Mathy E, et al. Impact of age on survival in radioiodine refractory differentiated thyroid cancer patients. *Eur J Endocrinol.* 2021;184(5):667-676
112. Oba T, Maeno K, Amitani M, et al. Prognostic significance of neutrophil-to-lymphocyte ratio for long-term outcomes in patients with poorly differentiated thyroid cancer. *Endocr J.* 2021;68(11):1329-1336