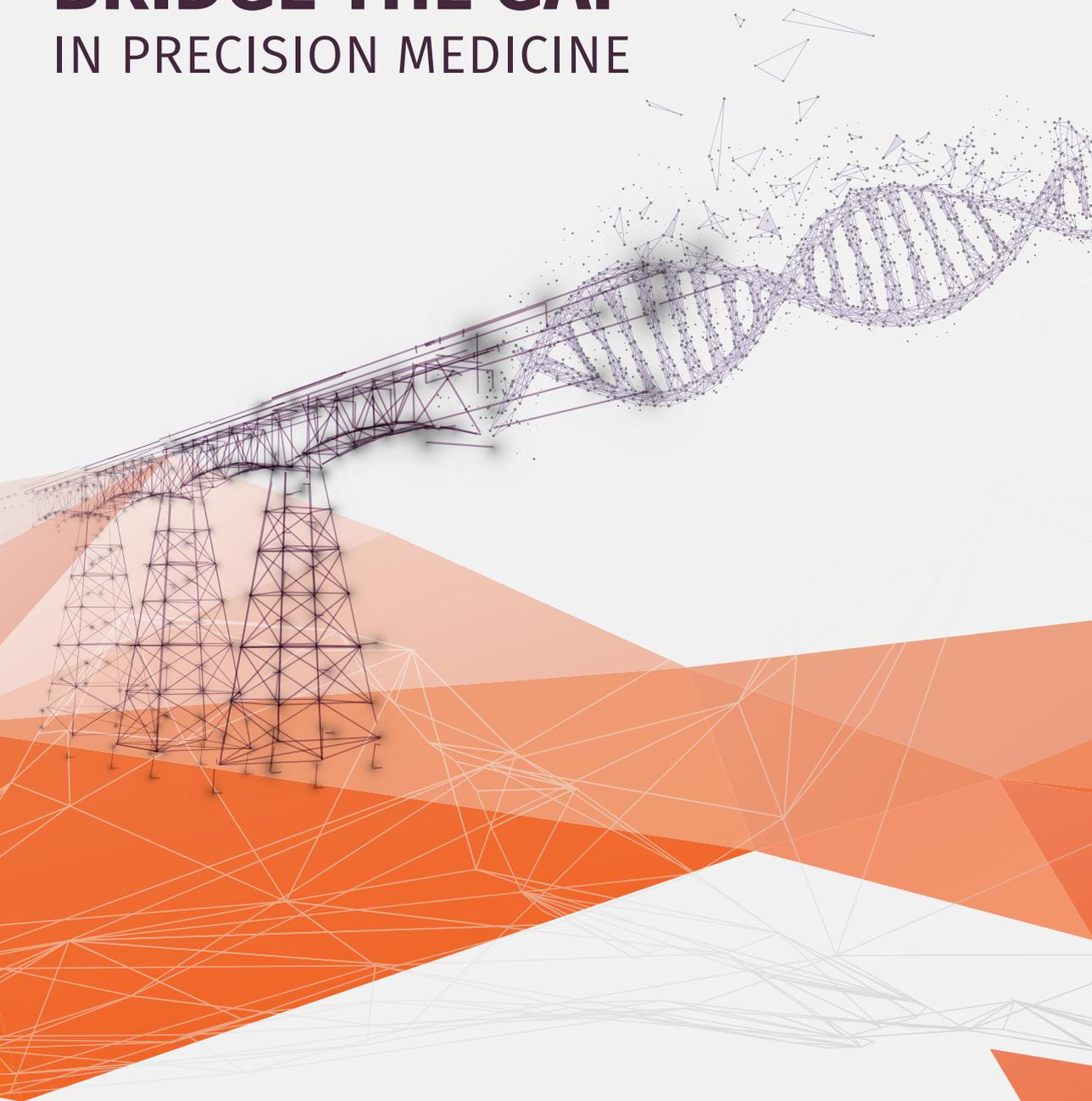


ATTI DEL CONVEGNO

BRIDGE THE GAP IN PRECISION MEDICINE



Napoli

10 – 11 giugno 2022

Razionale Scientifico

Negli ultimi anni l'avvento della medicina personalizzata ha notevolmente ampliato il quadro dei geni ai quali è riconosciuto il ruolo di biomarcatore di risposta al trattamento da analizzare nel tentativo di definire la strategia terapeutica più adeguata per i pazienti affetti da specifiche neoplasie solide. Il primo biomarcatore ad essere approvato nella stratificazione clinica del paziente affetto da carcinoma del polmone è stato il recettore del fattore di crescita epidermico (*EGFR*), le cui mutazioni nel dominio tirosin-chinasico conferiscono ai pazienti un beneficio clinico in termini di PFS mediana quando trattati con piccole molecole mimetiche dell'ATP anziché con la chemioterapia convenzionale. Nell'ultima decade, il panorama dei biomarcatori approvati in pratica clinica per la selezione dei pazienti eleggibili al trattamento con farmaci a bersaglio molecolare ha rapidamente incluso altri geni che assolvono alla medesima funzione in questo contesto clinico. Per tale motivo le società internazionali IASCL-AMP-CAP hanno posto chiarezza al riguardo elaborando un pannello di "must test genes" che devono essere testati ai fini della più corretta stratificazione clinica del paziente oncologico. Oltre a *EGFR*, sono annoverati in questo gruppo *BRAF* (mutazione puntiforme p.V600E), le traslocazioni a carico dei geni *ALK*, *ROS1*, *RET*, *NTRK* e le mutazioni causative dello *skipping* dell'esone 14 del gene *MET*. Recentemente il paradigma "un gene un biomarcatore" ha subito un brusco cambiamento in seguito all'approvazione di un farmaco a bersaglio molecolare diretto contro le cellule tumorali portatrici della mutazione p.G12C dell'esone 2 del gene *KRAS*. Tale approvazione ha sancito il passaggio di *KRAS* da biomarcatore predittivo negativo a biomarcatore predittivo positivo acquisendo un ruolo attivo nel guidare le decisioni cliniche per il paziente affetto da carcinoma del polmone. Alla complessità del panorama mutazionale appena descritto si associa la difficoltà tecnico-analitica nell'eseguire il test molecolare perché il materiale biologico destinato all'analisi è spesso scarso in quanto l'esame è richiesto esclusivamente negli stadi IIB-IV della malattia. Nel tentativo di superare la problematica dell'esiguità del materiale a disposizione su cui eseguire i differenti test molecolari a causa dell'incremento del numero dei biomarcatori richiesti, i laboratori di patologia molecolare hanno percepito l'esigenza di trasferire l'attività diagnostica su approcci analitici "multitesting", come ad esempio il sequenziamento genico di nuova generazione (NGS). Questo sistema è in grado di analizzare in una sola seduta analitica, indipendentemente dalla piattaforma utilizzata, più geni differenti per più pazienti simultaneamente. I pannelli di NGS oggi in commercio, tuttavia, sono spesso caratterizzati da una ridotta profondità di copertura delle sequenze geniche di interesse; da ciò deriva l'impossibilità di ottenere un risultato interpretabile nel 15-20% dei casi.⁽¹⁾

Il Carcinoma del Polmone Non a Piccole Cellule (NSCLC) è la tipologia di tumore solido per cui prevalentemente si solleva questa problematica perché nella maggior parte dei casi il test viene eseguito su campioni scarsamente cellulari, come ad esempio campioni citologici e piccole biopsie tessutali, che potrebbero non essere sufficienti per l'analisi dello stato mutazionale del recettore per il fattore di crescita epidermico (*EGFR*). Alla scarsa quantità degli acidi nucleici corrisponde anche una ridotta qualità, a causa di un'accentuata degradazione nei filamenti di DNA estratti da piccole biopsie o *cell-block*. In queste particolari tipologie di preparati, il corretto *management* del campione nelle fasi pre-analitiche non risulta sufficiente a garantire l'interpretabilità dei risultati molecolari. Nel tentativo di rispondere a questa esigenza diagnostica, l'utilizzo di pannelli genici *custom* caratterizzati dall'analisi di circa 6-20 geni si è rapidamente diffuso in pratica clinica.⁽²⁾ Nel laboratorio di patologia molecolare predittiva dell'Università degli Studi di Napoli Federico II è stato progettato e sviluppato un pannello genico ristretto per il sequenziamento genico di nuova generazione (SiRe®), che analizza 568 *hotspots* mutazionali in sei geni (*EGFR*, *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *CKIT* e *PDGFRa*) clinicamente rilevanti per il trattamento con farmaci biologici in quattro differenti neoplasie solide (NSCLC, carcinoma del colon-retto metastatico, tumori gastrointestinali stromali e melanoma). Il vantaggio di un pannello ristretto, rispetto a pannelli disponibili in commercio che analizzano un numero maggiore di geni, consiste in una migliore distribuzione (*coverage*) delle *reads* sugli *hotspots* mutazionali clinicamente rilevanti per la "target therapy". Le tecnologie *singleplex* sono inoltre caratterizzate da un ristretto *reference range* rispetto alle tecnologie *multiplex*. Questo implica che, per quanto sensibili e specifiche nell'andare a rilevare mutazioni in campioni della *routine* diagnostica, le mutazioni meno comuni non incluse nel *reference range* non risultano adeguatamente identificate aumentando il *rate* dei falsi negativi. Alla luce di tutte queste considerazioni, le piattaforme di NGS rappresentano l'approccio più adeguato per la valutazione dell'assetto molecolare dei geni che acquisiscono il ruolo di biomarcatore predittivo in pratica clinica. Una corretta formazione per l'utilizzo di queste piattaforme al fine di rendere omogenei i protocolli *wet* ed analitici rappresenta uno *step* cruciale per consentire il miglioramento delle procedure analitiche e di gestione clinica del paziente oncologico.⁽³⁾



Obiettivo del progetto

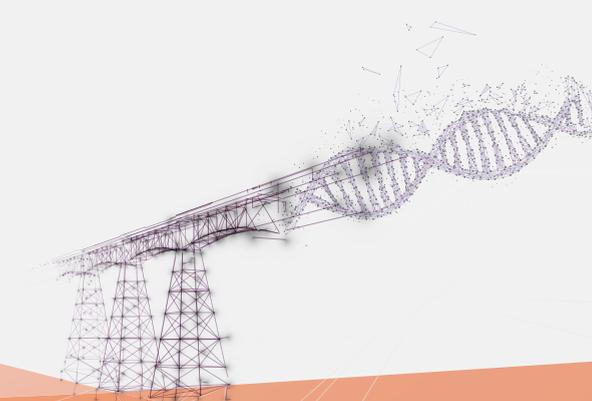
Le difficoltà analitiche relative alla scelta della tecnologia più adeguata sulla base delle caratteristiche del campione biologico prelevato dai pazienti affetti da NSCLC impattano enormemente sull'adeguatezza del test molecolare e quindi sulla possibilità per il paziente di accedere ad un percorso terapeutico personalizzato. Questi aspetti hanno posto le basi per lo sviluppo di questo progetto finalizzato all'identificazione delle criticità pre-analitiche (gestione e *management* del campione biologico) e analitiche (estrazione degli acidi nucleici e analisi molecolare) relative al campione biologico del paziente affetto da NSCLC. Il progetto si pone l'obiettivo di identificare assieme agli n=8 partecipanti al progetto, che rappresentano il composito e complesso quadro dei laboratori accreditati per l'esecuzione dei test molecolari sul territorio nazionale, i *pitfalls* analitici al fine di ottimizzare il percorso diagnostico per la caratterizzazione molecolare del paziente affetto da NSCLC.

Esercitazione pratica

Ciascun partecipante ha preso parte all'esercitazione pratica, svoltasi presso il laboratorio di patologia molecolare predittiva dell'Università Federico II di Napoli, finalizzata alla valutazione degli aspetti tecnici legati alla processazione del campione biologico, e all'esame molecolare volto alla caratterizzazione del profilo mutazionale delle cellule tumorali. Nel dettaglio, sono stati riprodotti i principali percorsi diagnostici di allestimento del preparato cito-istologico. Successivamente, sono state descritte le procedure estrattive manuali e automatizzate per il recupero e la purificazione degli acidi nucleici da tessuto e da sangue. Infine, sono stati analizzati in dettaglio i percorsi analitici basati sull'impiego di tecnologie di NGS dando maggiore rilievo alla fase interpretativa del dato di sequenza realizzata attraverso *software* di analisi di primo e di secondo livello. In ciascuna fase dell'esercitazione pratica, i partecipanti all'evento hanno assistito e attivamente preso parte alle attività poste in essere e hanno collegialmente discusso la propria esperienza in merito agli aspetti tecnici della profilazione molecolare.

Discussione

- ▶ La fase pre-analitica relativa al *management* del campione biologico, sia esso fluido o tessuto, rappresenta una fase imprescindibile che non può risultare slegata dal percorso analitico-diagnostico. Per quanto concerne il campione tissutale, il sezionamento al microtomo del blocchetto di tessuto incluso in paraffina (FFPE) e la scelta del protocollo di colorazione più adeguato finalizzato all'identificazione dei *cluster* neoplastici nel preparato sono cruciali ai fini dell'adeguatezza del risultato del test molecolare. Parallelamente, il campione di sangue periferico necessita di una gestione ancora più stringente rispetto al prelievo tissutale a causa dell'instabilità di cui risentono gli acidi nucleici circolanti. Per tale motivo, la separazione del plasma (che contiene gli acidi nucleici circolanti) deve essere realizzata entro il più breve tempo possibile dal prelievo al fine di ridurre risultati falsi negativi che verrebbero generati a causa dell'esiguità del materiale analizzato.
- ▶ La quantizzazione e qualificazione degli acidi nucleici estratti consiste in una fase preordinante ai fini della corretta esecuzione del test molecolare. Le differenti tipologie di campioni che pervengono al laboratorio di biologia molecolare e su cui deve essere avviata l'analisi sono distinguibili in: campioni con alta qualità-quantità degli acidi nucleici (campioni a fresco), campioni con scarsa qualità e alta quantità degli acidi nucleici (resezioni chirurgiche), campioni con alta qualità e scarsa quantità degli acidi nucleici (campioni citologici), campioni con scarsa qualità-quantità degli acidi nucleici (campioni allestiti *some cell-block*). Per tale motivo, l'analisi quantitativa e qualitativa degli acidi nucleici va incoraggiata al fine di armonizzare i test molecolari a seconda delle caratteristiche intrinseche del campione biologico. Nella fase della valutazione quali-quantitativa degli acidi nucleici, le metodiche fluorimetriche e microfluidiche consentono la più corretta valutazione relativa allo *status* degli acidi nucleici estratti.
- ▶ Esistono differenti strategie analitiche tendenzialmente suddivisibili in approcci *singleplex* e *multiplex*. Del primo gruppo fanno parte tutte le metodologie in grado di analizzare una singola alterazione in ogni seduta analitica (RT-PCR, dPCR), nel secondo gruppo sono annoverate tecnologie capaci di analizzare simultaneamente più *target* genici in più pazienti (NGS).



Un'ulteriore differenza tra queste due macrocategorie di approcci tecnici risiede nella possibilità di qualificare le alterazioni riscontrate. I saggi basati su approcci di RTPCR sono spesso viziati dall'impossibilità di nomenclare un'alterazione identificando la positività del campione con un gruppo di alterazioni. Tuttavia, nell'era della medicina di precisione il paradigma "un'alterazione un biomarcatore" viene soppiantato dal concetto "un'alterazione una terapia" che sottolinea come le differenti alterazioni molecolari che ricadono nello stesso gene hanno un peso specifico differente nel guidare il clinico ad un approccio terapeutico mirato. Infine, ultimo elemento di discussione è stato rappresentato dalle mutazioni classificate come "uncommon". Queste alterazioni sono caratterizzate da una minore frequenza di insorgenza nel NSCLC rispetto alle mutazioni convenzionali. L'utilizzo di piattaforme di RTPCR pregiudica la corretta *detection* di queste alterazioni a causa del ridotto *reference range* di queste tecnologie rispetto alle piattaforme di NGS.

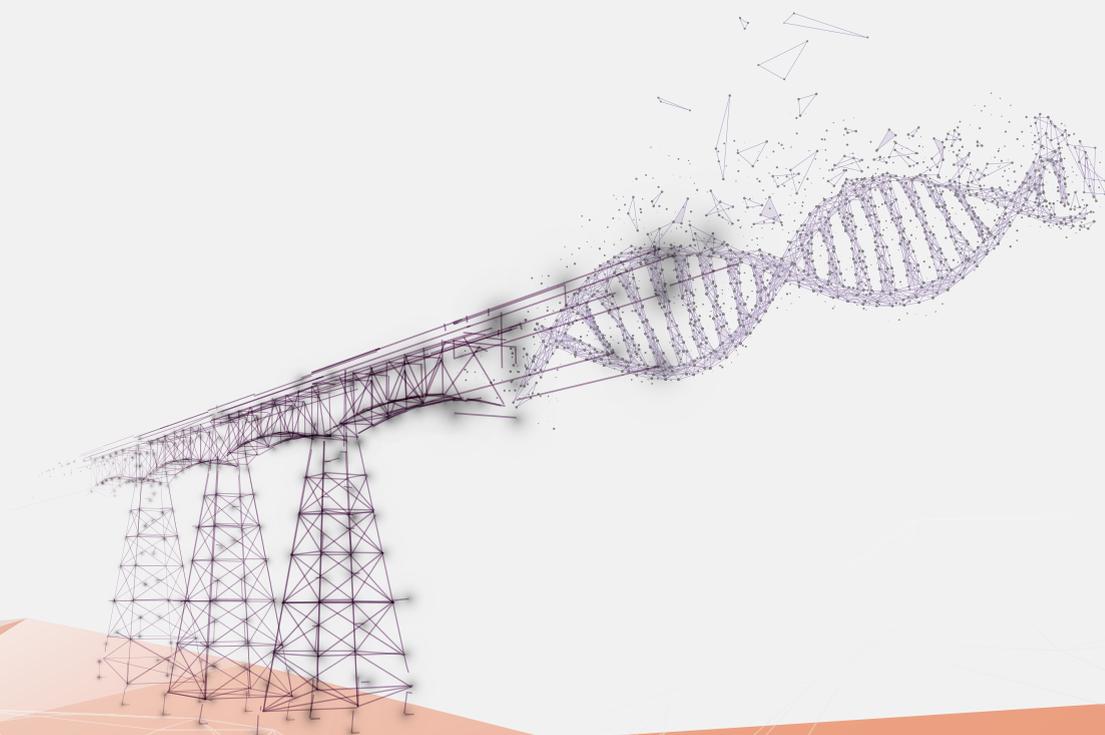
I *workflow* analitici finalizzati all'interpretazione del dato di sequenza fornito dalle piattaforme di NGS richiede un corretto *training* da parte dell'operatore. Spesso, l'impostazione sbagliata della *pipeline* di analisi si traduce nella generazione di risultati errati che pregiudicano la possibilità per il paziente di accedere ad un trattamento *target*. L'integrazione tra i *software* di analisi di primo e di secondo livello rappresenta una soluzione valida per risolvere le problematiche relative all'interpretazione del dato molecolare.

Take home message

La fase pre-analitica di gestione del campione tissutale e/o del prelievo di sangue periferico rappresenta una fase critica per la corretta interpretazione del risultato generato dalle piattaforme di *testing* molecolare. Questo *step* non può essere scorporato dal *workflow* analitico che si sviluppa in seno ai laboratori di anatomia patologica.

Nel contesto dei pazienti affetti da NSCLC, il prelievo tissutale risulta caratterizzato da una scarsa qualità e/o quantità degli acidi nucleici ricavati. L'utilizzo di tecnologie di NGS consente un'analisi omnicomprensiva di tutti i biomarcatori oggi approvati in pratica clinica, evitando di incorrere nel "sacrificio" di uno o più biomarcatori per evitare l'esaurimento del campione biologico.

- L'utilizzo di *pipelines* bioinformatiche ottimizzate e standardizzate per l'interpretazione del dato molecolare è fondamentale per la corretta interpretazione del dato. L'integrazione di algoritmi analitici di primo e di secondo livello consente una più adeguata gestione del risultato molecolare, in particolar modo nei casi dove la qualità dell'analisi molecolare è pregiudicata a causa delle caratteristiche del campione biologico.
- L'armonizzazione delle procedure lavorative si sviluppa attraverso la continua formazione di personale qualificato nella gestione del campione biologico dalla fase pre-analitica all'interpretazione del dato molecolare.
- Il momento della refertazione, vissuto collegialmente nell'ambito di un *team* multidisciplinare dove confluiscono vari interlocutori con differenti *expertise*, rappresenta il momento ultimo delle procedure analitiche e deve essere orientato alla generazione di un *report* analitico di immediata comprensione per il clinico che amministra il paziente oncologico.



Referenze

1. Kerr KM, Bibeau F, Thunnissen E, Botling J, Ryška A, Wolf J, Öhrling K, Burdon P, Malapelle U, Büttner R. The evolving landscape of biomarker testing for non-small cell lung cancer in Europe. *Lung Cancer*. 2021;154:161-175
2. Malapelle U, Mayo de-Las-Casas C, Rocco D, Garzon M, Pisapia P, Jordana-Ariza N, Russo M, Sgariglia R, De Luca C, Pepe F, Martinez-Bueno A, Morales-Espinosa D, González-Cao M, Karachaliou N, Viteri Ramirez S, Bellevicine C, Molina-Vila MA, Rosell R, Troncone G. Development of a gene panel for next-generation sequencing of clinically relevant mutations in cell-free DNA from cancer patients. *Br J Cancer*. 2017;116:802-810
3. Malapelle U, Pepe F, Pisapia P, Sgariglia R, Nacchio M, De Luca C, Lacalamita R, Tommasi S, Pinto R, Palomba G, Palmieri G, Vacirca D, Barberis M, Bottillo I, Grammatico P, Grillo LR, Costa V, Smeraglio R, Bruzzese D, Troncone G. Harmonization of Next-Generation Sequencing Procedure in Italian Laboratories: A Multi-Institutional Evaluation of the SiRe® Panel. *Front Oncol*. 2020;10:236

Progetto realizzato grazie
al sostegno non condizionante di



Medica
EDITORIA E DIFFUSIONE SCIENTIFICA