

ATTI DEL CONVEGNO

BRIDGE THE GAP IN PRECISION MEDICINE



Monza

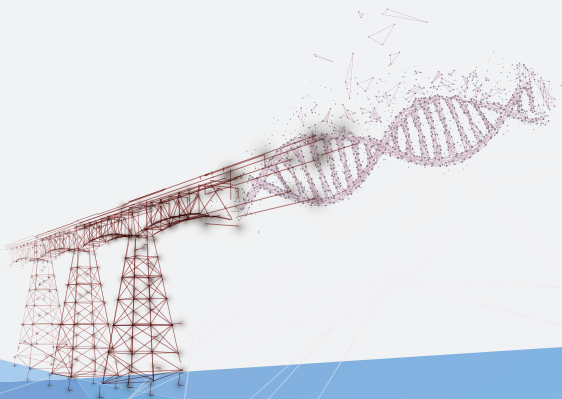
16 e 17 settembre 2022

Negli ultimi anni l'aumento esponenziale del numero dei geni classificati come biomarcatori predittivi di risposta al trattamento ha rivoluzionato l'approccio terapeutico degli oncologi clinici nella gestione dei pazienti affetti da neoplasie solide in stadio avanzato. Per i pazienti affetti da carcinoma al polmone a cellule non piccole (NSCLC) in aggiunta al recettore del fattore di crescita epidermico (*EGFR*), secondo le direttive emesse dalle società internazionali IASCL/AMP/CAP, è mandatorio testare le mutazioni puntiformi a carico dell'esone 15 del gene *BRAF* (p.V600E), le traslocazioni a carico dei geni *ALK*, *ROS1*, *RET*, *NTRK* e le mutazioni causative dello *skipping* aberrante dell'esone 14 del gene *MET* al fine di garantire il più esaustivo inquadramento clinico per il paziente affetto da NSCLC. La possibilità di individuare questa eterogenea tipologia di alterazioni molecolari implica, per i pazienti affetti da NSCLC portatori di tali alterazioni, la possibilità di beneficiare di una terapia basata su farmaci a bersaglio molecolare in grado di attaccare selettivamente le cellule tumorali. Negli ultimi anni, il sempre crescente interesse verso questa disciplina ha incrementato il numero di biomarcatori oggetto di valutazione all'interno di trials clinici. A riguardo, la convinzione che *KRAS* abbia unicamente accezione di biomarcatore predittivo negativo di risposta al trattamento è stata soppiantata dalle recenti evidenze scientifiche che hanno identificato un nuovo ruolo per *KRAS* nei pazienti affetti da NSCLC. In questo *setting*, l'approvazione di un farmaco a bersaglio molecolare diretto contro le cellule tumorali portatrici della mutazione p.G12C dell'esone 2 del gene *KRAS* ha identificato ruolo attivo di tale biomarcatore nella stratificazione clinica dei pazienti affetti da NSCLC.

In aggiunta al complesso ed eterogeneo panorama mutazionale corrispondono una serie di problematiche tecnico-analitiche che limitano la diffusibilità dell'esecuzione dei test molecolari. Una prima problematica di ordine tecnico riguarda la scarsa quantità di materiale reperibile nei pazienti in stato avanzato di malattia (IIIB-IV) che riduce le potenzialità analitiche delle piattaforme convenzionali disponibili in commercio per i test molecolari. Nella stragrande maggioranza dei centri che si occupano di patologia molecolare predittiva, infatti le tecnologie preposte all'analisi molecolari sono piattaforme di RqPCR in grado di analizzare specifiche alterazioni "hotspots" che conferiscano sensibilità al paziente nei confronti del trattamento a bersaglio molecolare. Sulla scorta di tali evidenze, i laboratori di patologia molecolare hanno percepito l'esigenza di trasferire l'attività diagnostica su approcci analitici "multi testing", come ad esempio il sequenziamento genico di nuova generazione (NGS). Questo sistema è in grado di analizzare in una sola seduta analitica differenti tipologie di alterazioni in

differenti biomarcatori per più pazienti nella stessa seduta analitica. Tuttavia, i pannelli in NGS disponibili in pratica clinica sono spesso inficiati da una ridotta sensibilità quando si trovano ad analizzare ridotte quantità di acido nucleico, evento che spesso caratterizza il campione della routine diagnostica per i pazienti affetti da NSCLC.⁽¹⁾

Il Carcinoma del Polmone Non a Piccole Cellule (NSCLC) rappresenta l'esempio più rilevante di come la tecnologia debba fronteggiare le esigenze tecnico diagnostiche. Tale campione è spesso caratterizzato da modalità di prelievo e campionamento (prelievi citologici e *cell-block*) che comportano l'acquisizione di una ridotta quantità e qualità degli acidi nucleici estratti conferendo un ulteriore livello di difficoltà all'analisi molecolare. 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 "tailored" sui biomarcatori per i quali è presente indicazione clinica, rappresenta un tentativo per superare le problematiche relative all'analisi molecolare nel setting diagnostico.⁽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 hotspot 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). L'armonizzazione dei protocolli tecnici incentrati sulla gestione dei campioni difficoltosi rappresenta un ulteriore ambito di indagine verso cui la comunità scientifica si sta indirizzando. Infine, 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 pre-analitiche ed analitiche relative all'esecuzione dei test molecolari sui campioni della pratica clinica impattano enormemente sulla corretta esecuzione del test molecolare e quindi sulla possibilità per il paziente di accedere ad un percorso terapeutico personalizzato. Questi aspetti hanno posto le premesse per lo sviluppo del progetto "Bridge the gap" finalizzato all'identificazione delle criticità pre-analitiche (gestione e management del campione biologico) ed analitiche (estrazione degli acidi nucleici ed analisi molecolare) relative al campione biologico del paziente affetto da NSCLC. Questo progetto si pone l'obiettivo di identificare assieme agli n=8 partecipanti al progetto rappresentativi della pratica clinica su territorio nazionale, i *pitfalls* analitici al fine di ottimizzare il percorso diagnostico per la caratterizzazione molecolare del paziente affetto da NSCLC.

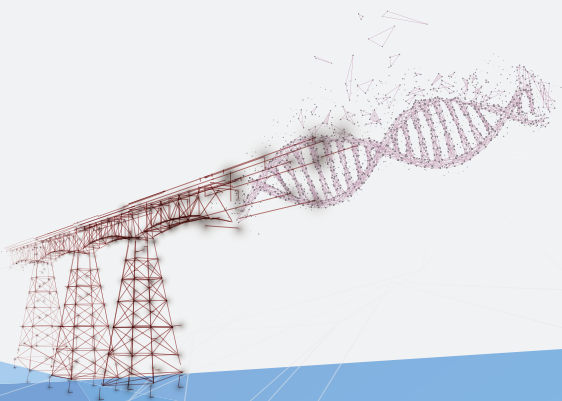
Esercitazione pratica

Ciascun partecipante ha preso parte all'esercitazione pratica, svoltasi presso il laboratorio di patologia molecolare predittiva dell'Università Bicocca di Monza, 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 discussi i principali percorsi diagnostici di allestimento del preparato cito-istologico. Successivamente, sono state descritte le procedure estrattive manuali ed automatizzate per il recupero e la purificazione degli acidi nucleici da tessuto e da sangue. Infine, sono state analizzati in dettaglio i percorsi analitici basati sull'impiego di tecnologie di NGS con particolare rilevanza alla fase interpretativa del dato di sequenza realizzata attraverso software di analisi di primo e di secondo livello. Per 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. Sono stati presentati casi clinici come spunto di riflessione per avviare la discussione delle problematiche tecnico-analitiche di gestione del campione. Sono state, infine, discusse ed analizzate le peculiarità analitiche di ciascun centro in ottica di evidenziare le criticità che riducono l'efficienza analitica per la caratterizzazione molecolare dei biomarcatori predittivi della pratica clinica.

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, la scelta del fissativo, il tempo di fissazione e il sezionamento del campione su una postazione dedicata rappresentano buone pratiche di laboratorio che riducono sensibilmente il rate di campioni inadeguati e, in particolare, di generare risultati falsi positivi derivanti da cross contaminazione del materiale biologico. Il campione di sangue periferico necessita di una gestione ancora più accurata 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 nel più breve tempo possibile dal prelievo al fine di ridurre risultati falsi negativi che verrebbero generati a causa dell'esiguità del materiale analizzato. A tale riguardo, l'utilizzo di provette contenenti stabilizzanti rappresenta un utile supporto diagnostico nella gestione del prelievo di sangue dai centri satelliti (richiedenti l'analisi) al centro *hub* (esecutore dell'analisi).

La quantizzazione e qualificazione degli acidi nucleici estratti rappresenta uno step preordinante per la 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 ed alta quantità degli acidi nucleici (resezioni chirurgiche), campioni con alta qualità e scarsa quantità degli acidi nucleici (campioni citologici), campioni con scarsa qualità/quantità di acidi nucleici (campioni allestiti come *cell-block*). Per tale motivo, l'analisi quantitativa e qualitativa degli acidi nucleici va incoraggiata e realizzata attraverso piattaforme adeguate alla tipologia di campione in analisi. 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 in quanto caratterizzate da una maggiore sensibilità e specificità analitica nella valutazione di frammenti scarsamente rappresentati nel campione biologico.



Le tecnologie finalizzate all'analisi molecolare si dividono in relazione alla tipologia di approccio analitico di cui dispongono. Le tecnologie *singleplex* permettono l'analisi di una singola alterazione in ogni seduta analitica (RTPCR, dPCR) mentre le tecnologie *multiplex* consentono di estendere le determinazioni a differenti hotspots in differenti geni di pazienti differenti (NGS)

Un'ulteriore differenza tra queste due macro categorie 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 della pipeline di analisi incongruente con la tipologia di analisi in atto si traduce nella generazione di risultati errati che pregiudicano al paziente la possibilità di accedere ad un trattamento più adeguato sulla base delle caratteristiche molecolari del paziente. 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 risulta imprescindibile e non scorporabile rispetto alle fasi analitiche e di analisi dati.

Nel contesto dei pazienti affetti da NSCLC, il prelievo tissutale risulta spesso inficiato da una ridotta qualità e/o quantità degli acidi nucleici ricavati. In questo setting, l'impiego di tecnologie di NGS permette di superare le limitazioni intrinseche delle tecnologie singleplex. In aggiunta, le piattaforme di NGS permettono un'analisi multi-comprensiva dei biomarcatori che trovano applicazione clinica fornendo, inoltre, una corretta "qualifica" della mutazione. La necessità di identificare la specifica alterazione (es.p.G12C) e non generalizzare la tipologia di alterazione rilevata (es p.G12X) è preordinante alla selezione dei pazienti al trattamento terapeutico più idoneo.

L'utilizzo di *pipeline* 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 analitiche 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.



Reference

1. KKerr KM, Bibeau F, Thunnissen E, Botling J, Ryška A, Wolf J, Öhring 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