

# Raccomandazioni 2020 per l'esecuzione di Test Molecolari su Biopsia Liquida in Oncologia

A cura del Gruppo di Lavoro AIOM – SIAPEC-IAP – SIBIOC – SIF



Società Italiana di Anatomia Patologica  
e Citologia Diagnostica - Divisione Italiana  
della International Academy of Pathology



SOCIETÀ ITALIANA  
DI FARMACOLOGIA

*Giordano Beretta, Ettore Capoluongo, Romano Danesi, Marzia Del Re, Matteo Fassan, Giuseppe Giuffrè, Stefania Gori, Valerio Gristina, Lorena Incorvaia, Umberto Malapelle, Antonio Marchetti, Nicola Normanno, Carmine Pinto, Giulio Rossi, Andrea Sartore Bianchi, Nicola Silvestris, Pierosandro Tagliaferri, Giancarlo Troncone e Antonio Russo.*

*Luglio 2020*



## **Sommario**

1. **Biopsia liquida: definizione**
2. **Problematiche pre-analitiche: dal prelievo di sangue al cfDNA**
3. **Estrazione, quantificazione e conservazione del cfDNA**
4. **Metodiche per lo studio delle mutazioni nel ctDNA**
  - 4.1 Real Time PCR
  - 4.2 digital PCR (dPCR)
  - 4.3 NGS
5. **Applicazioni della biopsia liquida in pratica clinica**
  - 5.1 NSCLC
6. **Applicazioni cliniche emergenti**
  - 6.2 Carcinoma del colon-retto
  - 6.3 Carcinoma della mammella
  - 6.4 Melanoma
7. **Problematiche di Clinical Utility, sostenibilità, accesso al test molecolare e accesso ai Farmaci su Indicazione biopsia liquida in un SSN universalistico**
8. **Applicazioni della biopsia liquida nel contesto della ricerca clinica**
  - 8.1 Monitoraggio della risposta alla terapia
  - 8.2 Analisi di liquidi biologici diversi dal plasma
  - 8.3 Potenziali applicazioni nell' immunoterapia
9. **La refertazione**

## 1. *Biopsia liquida: definizione*

Con il termine biopsia liquida si fa riferimento all'utilizzo di fluidi biologici come surrogato al tessuto neoplastico per ottenere informazioni utili ai fini diagnostici, prognostici o per predire la risposta alla terapia con terapie a bersaglio molecolare. L'analisi del DNA tumorale circolante (*circulating tumor DNA*, ctDNA) che rappresenta una frazione del DNA libero circolante (*cell free DNA*, cfDNA) isolato dal sangue periferico (principalmente plasma), rappresenta ad oggi il principale approccio di biopsia liquida impiegato nella pratica clinica. Tuttavia, è possibile che nel futuro altri derivati ottenuti dal sangue, quali le cellule tumorali circolanti (CTC), l'RNA tumorale circolante ed i microRNA (miRNA), le piastrine, gli esosomi, come pure altri fluidi biologici quali le urine ed il liquido cefalorachidiano, possano essere utilizzati nella pratica clinica per avere ulteriori informazioni rispetto a quelle ottenibili mediante l'analisi del solo ctDNA estratto da plasma. La quota di cf/ctDNA può variare in relazione al momento di raccolta del campione ed alla condizione clinica del paziente.

Nell'attuale pratica clinica, per biopsia liquida ci si riferisce generalmente all'identificazione di mutazioni *driver* presenti nel ctDNA derivanti sia dal tumore che dalle cellule tumorali circolanti (1). Il ctDNA è tuttavia una frazione, a volte estremamente esigua, del cfDNA totale che è possibile isolare dal plasma dei pazienti neoplastici e che contiene anche DNA derivante da cellule non tumorali.

Alcuni sistemi commerciali (con marchio CE-IVD) reperibili sul mercato europeo ed italiano riportano come analita il ctDNA mentre altri il cfDNA, dato che quando si effettua l'analisi non si ha certezza della presenza di DNA di origine tumorale fino all'eventuale rilevazione di una mutazione.


Per questo motivo, nel presente documento si farà riferimento al cfDNA più in generale, ed al ctDNA in caso di positività per le mutazioni oggetto dell'analisi.

La biopsia liquida presenta alcuni evidenti vantaggi rispetto alla biopsia tissutale, ovvero:

- la procedura non è invasiva, in quanto si tratta di un semplice prelievo di sangue pressoché privo di complicanze;
- può essere ripetuta nel tempo per monitorare l'evoluzione molecolare della malattia, sebbene non esista ad oggi evidenza che indirizzi a modificare la scelta terapeutica, in assenza di progressione clinica di malattia;
- è in grado di rappresentare in maniera più esaustiva rispetto alla biopsia tissutale l'eterogeneità molecolare della malattia contenendo, almeno potenzialmente, DNA tumorale derivante dalle diverse aree di uno stesso tumore e dalle differenti possibili sedi di malattia.

La transizione dal cfDNA come interesse di ricerca ad importante strumento di diagnostica routinaria di laboratorio nelle neoplasie è tuttora un processo lento e uno dei motivi principali riguarda una serie di problematiche pre-analitiche che restano ancora difficili da superare.

La biopsia liquida presenta inoltre alcuni limiti, sia legati alla biologia del tumore che a problematiche relative alle tecnologiche utilizzate.



Tra le problematiche di natura biologica:

- a) la quantità di ctDNA nel contesto del cfDNA è spesso estremamente limitata, in funzione sia del volume che delle localizzazioni di malattia, e ciò può determinare risultati “falsi negativi” sul campione di biopsia liquida;
- b) l’eterogeneità tumorale rappresenta un fattore da tenere in considerazione durante l’interpretazione dei risultati ottenuti da un’analisi condotta a partire dal ctDNA;
- c) la scelta della sorgente da cui estrarre il cf/ctDNA (sangue, liquidi cavitari, ecc.).

Le problematiche metodologiche e tecnologiche riguardano prevalentemente:

- d) raccolta e processazione del campione
- e) conservazione
- f) scongelamento
- g) isolamento del cfDNA
- h) conservazione del cfDNA.

Per ciascuno degli aspetti (da “d” a “h”), esistono numerose opzioni metodologiche tra cui scegliere, oltre che una vasta scelta di prodotti commerciali costantemente in aggiornamento: a seconda della tipologia di soluzione adottata, il metodo scelto può influire in varia misura sull’esito delle misurazioni sul cfDNA.

Per effetto di tali variabilità, non è facile raggiungere un consenso sulle procedure pre-analitiche ottimali: risulta pertanto molto impegnativo e difficile stabilire standard applicabili diffusamente.

L’assenza di un percorso di armonizzazione delle procedure, al momento, pone le seguenti problematiche:

- a) necessità di una presentazione arbitraria dei dati quantitativi e qualitativi relativi alle indagini condotte su cfDNA in un campione;
- b) difficoltà nella riproducibilità dei dati di cfDNA;
- c) limitazioni nei confronti inter-individuali e inter-studio
- d) difficoltà nell’interpretazione risultati

La convergenza di tutti questi fattori ostacola l’ottimizzazione sistematica dei protocolli ed il rapido sviluppo nella routine clinica dei test su cfDNA. Quindi, nell’approccio all’analisi del cfDNA bisogna tener conto dell’importanza degli aspetti della fase pre-analitica, oltre che di quella post-analitica, al fine di non pregiudicare la qualità dei risultati.

#### **Bibliografia**

1. Russo A, Giordano A, Rolfo C, et al. Liquid biopsy in cancer patients: the hand lens to investigate tumor evolution. Current Clinical Pathology. Springer International Publishing 2017.

## 2. Problematiche pre-analitiche: dal prelievo di sangue al cfDNA

La maggior parte dei tipi di cellule umane rilasciano frammenti del loro genoma nei fluidi corporei e nel sistema circolatorio. Poiché queste molecole di cfDNA sono stabili e mantengono le caratteristiche genetiche ed epigenetiche distintive delle cellule da cui provengono, possono essere candidati ideali alla valutazione di biomarcatori per la rilevazione e il monitoraggio di disordini genomici, particolarmente quelli presenti nei tumori solidi o nelle anomalie genetiche fetali. Il cfDNA rilasciato per apoptosi è di gran lunga più corto (166-498 kb) di quello rilasciato per necrosi (anche di lunghezza superiore a 10 kb).

Come descritto in precedenza, il cfDNA può essere estratto da diversi liquidi biologici. Tuttavia, le procedure maggiormente standardizzate nella pratica clinica riguardano l'isolamento del cfDNA dal sangue periferico.

La quantità di DNA che è possibile estrarre dal sangue periferico è spesso molto limitata, nella misura di pochi ng/ml, di cui il ctDNA è solo una piccolissima frazione. La concentrazione di ctDNA è solo tra 1 e 10 ng/ml circa negli individui asintomatici: pertanto, al fine di raggiungere la sensibilità del 95%, è stato dimostrato che, ad esempio, per lo *screening* del carcinoma mammario, sono necessari da 150 a 300 ml di campione di sangue per test. La relazione tra la concentrazione di molecole mutanti (ctDNA) e cfDNA possono essere descritte come frazione allelica mutante (*Mutant Allele Frequency, MAF*).


Infatti, la concentrazione del DNA *target* nel plasma dipende da diversi fattori, tra cui: il carico di malattia, i livelli di espressione della mutazione nelle cellule del tumore primitivo, la velocità di rilascio del ctDNA nel torrente circolatorio e i livelli di DNA rilasciati da cellule non trasformate (ad esempio, in conseguenza di processi infiammatori che si instaurano nel tessuto sano e che circonda il tumore o di lisi dei leucociti dopo il prelievo di sangue). Per questi motivi la fase pre-analitica deve essere attentamente controllata.

Un primo problema che potrebbe inficiare la qualità del campione è costituito dall'emolisi determinata durante la flebotomia: è necessario, pertanto, che il prelievo di sangue sia effettuato da personale altamente qualificato.

Il cfDNA può essere isolato dal siero o dal plasma. Tuttavia, diversi studi hanno dimostrato che l'uso del plasma è da preferirsi al siero; in quest'ultimo, infatti, il processo di coagulazione causa il rilascio di DNA genomico derivante dai leucociti. Non esistono al momento indicazioni conclusive sulla quantità di sangue da impiegare ai fini diagnostici. Tuttavia, molti kit diagnostici indicano la quantità minima di plasma necessaria per l'analisi.

Il prelievo può essere raccolto in tubi standard K2- o K3-EDTA (contenenti acido etilendiamminotetraacetico) oppure impiegando tubi contenenti speciali fissativi, in grado di stabilizzare il sangue ed il cfDNA per diversi giorni. Se il prelievo è effettuato impiegando tubi standard, si deve tenere conto di due fattori importanti:

1. il cfDNA ha una breve emivita, stimata in circa 2,5 ore;
2. diversi studi hanno dimostrato che superate le tre ore dal prelievo si può verificare una lisi dei leucociti con conseguente rilascio di DNA germinale che determina una diluizione del DNA tumorale. Pertanto, il sangue raccolto in tubi contenenti solo EDTA può essere conservato prima



dell'isolamento del plasma per un massimo di 3 ore a temperatura ambiente. La conservazione del sangue alla temperatura di 4 °C non previene la lisi dei leucociti.


Nei casi in cui non sia possibile processare il campione entro le 3 ore dal prelievo, si raccomanda l'utilizzo di tubi contenenti specifici conservanti in grado di stabilizzare sia il cfDNA che i leucociti. Tuttavia, questi tubi garantiscono, in genere, la conservazione del prelievo solo in un *range* limitato di temperatura (16-24°C). Pertanto, è importante assicurarsi che queste temperature siano rispettate in caso di trasporto del campione. Per l'eliminazione dei residui cellulari e per ottenere un campione idoneo alle successive analisi, il plasma deve essere isolato mediante centrifugazione, assicurandosi di aver completamente allontanato il contaminante leucocitario derivante dal *buffy coat*. Esistono diversi protocolli di centrifugazione. È consigliabile eseguire una prima centrifugazione a bassa velocità (1200-1600g) per evitare la lisi dei leucociti ed una successiva centrifugazione del sopranatante ad elevata velocità ( $\geq 3000g$ ) per rimuovere tutti i contaminanti. Le centrifugazioni devono essere eseguite senza freno. È suggerito anche l'impiego di una centrifuga refrigerata (4°C). Il plasma ottenuto può essere conservato a -20°C per brevi periodi (~1 mese) o, per periodi più prolungati, a -80°C, temperatura che garantisce una maggiore stabilità del cfDNA. Tuttavia, all'aumentare del periodo di conservazione diminuisce la quantità totale di cfDNA che è possibile estrarre, soprattutto se il campione dovesse essere sottoposto a cicli di congelamento e scongelamento.

### ***3. Estrazione, quantificazione e conservazione del cfDNA***

Esistono molti metodi per l'estrazione del cfDNA, che comprendono sia l'utilizzo di kit commerciali che di protocolli sviluppati dai laboratori. A causa della piccola quantità e della natura molto frammentata del cfDNA nel plasma (<1.000 bp), non dovrebbero essere utilizzate metodiche di estrazione validate su campioni tissutali o su altre matrici biologiche. Il metodo di estrazione deve essere molto affidabile e deve garantire quanto più cfDNA possibile del campione in esame, per non compromettere il risultato dell'analisi e generare risultati falsi negativi o positivi.

Vi è un ulteriore aspetto critico che è legato al momento in cui il prelievo viene effettuato: la situazione cambia se si è di fronte a stadi avanzati di malattia rispetto a quelli precoci. È stato dimostrato che la concentrazione di ctDNA nel plasma è correlata alla dimensione del tumore ed allo stadio. I pazienti con malattia in stadio I, per vari tipi di tumore, presentano meno di 10 copie di mutazioni tumorali/5 ml di plasma. Al contrario, il numero di copie è aumentato da 10 a 100 volte tra i pazienti in fase avanzata. Pertanto, i test del ctDNA utilizzati a fini di diagnosi precoce di neoplasia dovrebbero essere altamente sensibili: tuttavia, i test altamente sensibili sono sempre costosi, rendendo non realistiche le applicazioni pratiche su larga scala. C'è sempre un compromesso tra sensibilità e costi. Sono stati proposti vari metodi per ridurre i costi, il rumore di fondo e gli errori indotti nella fase di amplificazione (1).

Per l'estrazione e la purificazione del cfDNA da plasma sono oggi disponibili vari kit commerciali dedicati a questo specifico uso. Questi kit sono in genere basati sull'utilizzo di colonnine dotate di membrane di silice, in associazione con pompa a vuoto, oppure sull'impiego di biglie magnetiche, per la cattura degli acidi nucleici.



Questi sistemi sono corredati da protocolli di semplice esecuzione e permettono di estrarre da 1 a 24 campioni, freschi o congelati, simultaneamente, e catturare frammenti di cfDNA da plasma a partire da un minimo di 10 µl a un massimo di 10 ml di campione. In generale, si ritiene che 2 ml di plasma sia la quantità minima necessaria in grado di fornire risultati accurati utilizzando le diverse metodiche di estrazione. Inoltre, la maggior parte dei kit sopra citati contiene reagenti o, in generale, dispositivi, in grado di concentrare l'eluato in un volume flessibile di eluizione (20-150 µl).

Una volta estratto, il cfDNA deve essere sottoposto a quantificazione, in modo da ottimizzare il processo di amplificazione e permettere di conoscere se le successive analisi molecolari possano essere possibili a partire dal cfDNA estratto. L'accuratezza nella fase di quantificazione può essere ottenuta con sistemi di elettroforesi capillare oppure fluorimetrici. In generale, i kit di estrazione sopra citati consentono di ottenere campioni di cfDNA di alta qualità e con una concentrazione superiore a 5 ng/ml. La quantità di cfDNA estratto è comunque influenzata dallo stato di malattia e dal momento in cui viene effettuato il prelievo.

La conservazione ottimale del cfDNA ne consente un utilizzo anche a distanza di tempo per poter eseguire ulteriori indagini molecolari, previo esplicito consenso informato da parte del paziente. Il processo richiede una strumentazione adeguata, tra cui congelatori in grado di raggiungere temperature di -20°C/-80°C, dispositivi di controllo grafico della temperatura, sistemi di allarme acustico, controlli di qualità del materiale biologico conservato.

#### **Bibliografia**

1. Ungerer V, Bronkhorst A J, Holdenrieder S et al. Preanalytical variables that affect the outcome of cell-free DNA measurements. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. 2020; doi: 10.1080/10408363.2020.1750558

## ***4. Metodiche per lo studio delle mutazioni nel ctDNA***


### ***4.1. Real Time PCR***

La *Real Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)* è attualmente la metodica *gold standard* per l'analisi di mutazioni puntiformi e/o di piccole inserzioni/delezioni su ctDNA. La considerevole diffusione di tale metodica nei laboratori di diagnostica molecolare rappresenta una valida soluzione in quanto rapida ed economica. Varie modifiche sono state introdotte per incrementarne la sensibilità diagnostica. Una di queste è la tecnologia *Amplification Refractory Mutation System (ARMS)/SCORPION* che aumenta la sensibilità tramite co-amplificazione di uno o più alleli mutati del gene d'interesse e un gene di controllo endogeno. Inoltre, una specifica miscela di oligonucleotidi di controllo consente la valutazione della qualità e quantità del DNA presente nei campioni. L'analisi permette, mediante amplificazione con sonde sequenza-specifiche marcate con *FAM* ed *HEX*, di rilevare basse percentuali di allele mutato, anche in presenza di elevate quantità di DNA genomico *wild-type*, arrivando ad un limite di rilevazione (*limit of detection, LOD*) anche inferiore allo 0,5%.

## 4.2. Digital PCR (dPCR)

La *digital polymerase chain reaction (dPCR)* rappresenta un avanzamento tecnologico della classica *PCR* (1). Il termine “*digital*” fa riferimento alla modalità di rilevazione di tipo binario, presenza o assenza, del segnale di amplificazione al termine dell’amplificazione stessa all’interno di molteplici camere di reazione o bio-reattori. Esistono tre tipi di piattaforme: 1) *digital droplet PCR (ddPCR)*, 2) *digital solid PCR (dsPCR)*, e 3) *BEAMing (Beam, Emulsion, Amplification, Magnetics) dPCR*. Nella *ddPCR* i bio-reattori sono rappresentati da decine migliaia (circa 20000) di *droplets* (goccioline) omogenee in un’emulsione olio-acqua (2). Per evitare la procedura di emulsione e la possibilità di rottura delle *droplets*, con conseguente diminuzione del numero dei bio-reattori, nella *dsPCR* i bio-reattori sono rappresentati da decine di migliaia di pozzetti (12000) scavati tramite un laser su un supporto solido (*chip*) (3). In entrambi i casi quello che avviene è la distribuzione di singole molecole di DNA all’interno dei bio-reattori secondo il principio statistico della distribuzione di Poisson (1). Per permettere la reazione di amplificazione, vengono dispensati all’interno dei bio-reattori anche la *master mix* e specifiche sonde fluorescenti (una per l’allele *wild-type* ed una per l’allele mutato). L’amplificazione dello specifico bersaglio all’interno del bio-reattore viene valutata tramite la rilevazione della fluorescenza emessa dalle sonde (1). Questa compartimentalizzazione della reazione di amplificazione permette di identificare e quantificare in maniera assoluta anche piccolissime quantità di allele mutato in un *background* di alleli *wild-type*, caratteristica che risulta fondamentale quando si considera la ricerca di mutazioni nel ctDNA, poco rappresentato rispetto al carico di DNA germinale *wild-type* presente in circolo. Infatti, la ripartizione in goccioline del DNA da analizzare aumenta la specificità e la sensibilità dell’analisi mediante la riduzione della competizione esistente tra il DNA tumorale mutato ed il DNA *wild-type*. Questo consente di valutare con elevata precisione e riproducibilità campioni con una percentuale di alleli mutati pari allo 0.1% (2). Tramite appositi *software*, i risultati possono essere elaborati a fornire la concentrazione della mutazione in termini di copie/ $\mu$ l, copie/ml, frazione allelica, rapporto tra gli alleli e *fractional abundance*. Differentemente dalle altre due piattaforme, il *BEAMing dPCR* richiede una fase di pre-amplificazione del DNA di interesse mediante una *PCR* standard (4). A questo punto i prodotti di amplificazione vengono distribuiti in migliaia di *droplets* omogenee generate con un’emulsione olio-acqua a cui vengono aggiunte microsferiche magnetiche che legano i prodotti di *PCR*. Queste ultime vengono successivamente isolate tramite centrifugazione o mediante un magnete. Infine, mediante una scansione ottica o la citometria a flusso è possibile quantificare il DNA legato alle microsferiche. Questo approccio consente di analizzare campioni con una percentuale di alleli mutati pari allo 0.01% (4). La quantità di DNA richiesta per l’amplificazione in *dPCR* è di 3 ng (con un *range* di 50 fg-100 ng) e di 3-30 ng per la *BEAMing dPCR*. Nonostante quest’ultima presenti una maggiore sensibilità rispetto alle altre due tecnologie, la specificità risulta essere più bassa (87% vs. 97%). Nello studio clinico AURA è emerso come la maggiore difficoltà della *BEAMing dPCR* si riscontrasse quando si andava a considerare la mutazione di resistenza p.T790M nell’esone 20 di *EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor)* (sensibilità e specificità pari al 70.3% e 69.0%, rispettivamente) (5). Inoltre, a causa degli elevati costi e della complessità della metodica, con necessità di una lunga curva di apprendimento da parte del personale di laboratorio, la tecnologia *BEAMing dPCR* risulta essere poco adatta alla pratica clinica (6). Un ulteriore limite






della *dPCR*, a differenza delle metodiche basate sul sequenziamento, è rappresentato dalla sua capacità di identificare solo mutazioni note. Questo impedisce la possibilità di identificare mutazioni molto rare o nuove alterazioni. Inoltre, elementi come etanolo o paraffina (come quella utilizzata in alcuni tubi per preservare la lisi cellulare) possono interferire con la formazione dell'emulsione rendendo l'analisi non valutabile. Nonostante questi limiti, la *dPCR* può essere una valida metodica per confermare i risultati ottenuti mediante sequenziamento, e ci permette, quantificando in maniera assoluta il numero di alleli mutati, di monitorare i pazienti nel tempo, consentendo una corretta valutazione della risposta clinica ad un determinato trattamento (7).

<b>Raccomandazioni per il protocollo di <i>dPCR</i></b>
L'allestimento delle reazioni di <i>dPCR</i> deve avvenire sotto cappa a flusso laminare, in un ambiente differente da quello utilizzato per la fase di estrazione del ctDNA e dell'analisi dei prodotti di amplificazione, evitando contaminazioni (camice dedicato, guanti, puntali con filtro, ecc.). In ogni caso, va predisposta un'area dedicata alle procedure di preparazione in <i>dPCR</i> .
A questo punto si prepara la soluzione contenente il DNA, la <i>master mix</i> e le sonde. Quando si esegue la <i>ddPCR</i> è previsto uno <i>step</i> in cui questa soluzione viene trasferita in un'apposita cartuccia, all'interno della quale viene dispensato l'olio per formare l'emulsione. La cartuccia viene poi introdotta nell'apposito <i>droplet generator</i> a formare le gocce contenute nell'emulsione olio-acqua. Il passaggio successivo prevede il trasferimento dell'emulsione dalla cartuccia alla piastra da 96 pozzetti, per procedere poi con la reazione di amplificazione.
Per ogni analisi sono previsti un controllo positivo di amplificazione (ad esempio, utilizzando un campione di ctDNA precedentemente validato) e un controllo negativo (ossia, la miscela di reazione priva di templatato di DNA).
Come per ogni nuova procedura, ogni laboratorio dovrebbe validare la metodica di <i>dPCR</i> in via preventiva utilizzando diluizioni di DNA mutato in DNA non-mutato da linee cellulari il cui stato mutazionale di <i>EGFR</i> sia noto. In alternativa, si può ricorrere a campioni di riferimento certificati che garantiscono una corretta determinazione di sensibilità, specificità e LOD.
L'analisi dei risultati avviene grazie all'uso di un lettore connesso a un computer in cui uno specifico software è in grado di trasformare il segnale da analogico a digitale e rilevare le goccioline negative (prive del DNA <i>target</i> e/o del DNA di riferimento) e positive (che contengono l'allele <i>target</i> ) in ciascun campione grazie alle varie fluorescenze rilevate.

Le metodiche di *dPCR*, a differenza della classica *RT-PCR* o del sequenziamento genico di nuova generazione (*NGS*), non analizzano autonomamente i risultati, ma è necessario che l'operatore definisca la soglia di positività in base al risultato stesso.

Per questo motivo, è molto importante non solo che il laboratorio acquisisca una adeguata esperienza eseguendo numerosi test, ma anche che l'interpretazione dei risultati (soprattutto quelli *borderline*) avvenga alla luce sia di parametri pre-analitici ed analitici, che clinici.

I risultati di dubbia interpretazione possono riguardare la presenza di un segnale di qualità non ottimale, oppure l'assenza di una mutazione in presenza di progressione di malattia.



In entrambi i casi è necessario assicurarsi che le condizioni della gestione del campione abbia rispettato i requisiti pre-analitici (si rimanda al paragrafo 3), al fine di escludere eventuali problematiche tecniche.

Se si escludono problematiche pre-analitiche, potrebbe essere utile valutare alcuni dei requisiti clinici al fine di interpretare il risultato. Infatti, poiché la qualità e la quantità del DNA ricavato dal plasma è dipendente da alcune caratteristiche strettamente legate alla malattia, è necessario tenere in considerazione il carico e le sedi di malattia, le sedi di progressione di malattia, il trattamento in corso ed i trattamenti precedenti, il tempo alla progressione. Basso carico di malattia, progressioni encefaliche o ossee caratterizzano generalmente il tumore a basso rilascio di ctDNA, che dovrebbe dunque allertare il laboratorista per il rischio di un possibile falso negativo (in assenza di mutazioni) o effettivo positivo (nel caso del risultato *borderline*) (8).


#### **Bibliografia**

1. Vogelstein B, Kinzler KW. Digital PCR. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96:9236-41.
2. Zhang BO, Xu CW, Shao Y, et al. Comparison of droplet digital PCR and conventional quantitative PCR for measuring EGFR gene mutation. Exp Ther Med. 2015;9:1383-1388.
3. Malapelle U, de Luca C, Vigliar E, et al. EGFR mutation detection on routine cytological smears of non-small cell lung cancer by digital PCR: a validation study. J Clin Pathol. 2016;69:454-7.
4. Diehl F, Li M, He Y, et al. BEAMing: single-molecule PCR on microparticles in water-in-oil emulsions. Nat Methods. 2006;3:551-9.
5. Oxnard GR, Thress KS, Alden RS, et al. Association Between Plasma Genotyping and Outcomes of Treatment With Osimertinib (AZD9291) in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. J Clin Oncol. 2016;34:3375-82.
6. Rolfo C, Mack PC, Scagliotti GV, et al. Liquid Biopsy for Advanced Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC): A Statement Paper from the IASLC. J Thorac Oncol. 2018;13:1248-1268.
7. Pisapia P, Malapelle U, Troncone G. Liquid Biopsy and Lung Cancer. Acta Cytol. 2019;63:489-496.
8. Passiglia F, Rizzo S, Russo A, et al. The diagnostic accuracy of circulating tumor DNA for the detection of EGFR-T790M mutation in NSCLC: a systematic review and meta-analysis. Sci Rep. 2018 Sep 6;8(1):13379.

#### **4.3. Next-generation sequencing (NGS)**

Le tecniche di *ddPCR* e *RT-PCR* sono ampiamente utilizzate nella pratica clinica per l'analisi del ctDNA, per la loro elevata sensibilità e buona specificità. Tuttavia, queste metodiche presentano il limite di poter analizzare solo alcuni tipi di alterazioni genetiche (mutazioni puntiformi e brevi indels) e di poter interrogare un numero limitato di loci per analisi. Esse sono pertanto inadeguate per una determinazione complessiva del profilo genetico delle neoplasie e per l'analisi di alterazioni genetiche complesse quali ad esempio i riarrangiamenti che determinano fusioni geniche.

La *next-generation sequencing (NGS)* e soprattutto le applicazioni di *targeted sequencing* mirate alla analisi di regioni limitate del genoma, possono in teoria superare le suddette limitazioni. Infatti, con questi approcci è possibile identificare contemporaneamente tutti i diversi tipi di alterazioni genetiche in più geni in una singola analisi. La *NGS* può inoltre identificare nuove mutazioni che non potrebbero essere rilevate con tecnologie non basate su sequenziamento, come appunto la *ddPCR* e la *RT-PCR*. L'utilizzo della *NGS* per l'analisi della biopsia liquida è stato per lungo tempo limitato dalla sua relativamente bassa sensibilità. In particolare, i pannelli di *targeted sequencing* standard, comunemente usati per l'analisi molecolare dei campioni di tessuto, hanno una sensibilità di circa l'1-



2% che ne limita la possibilità di utilizzo per i test su ctDNA (1). Infatti, mutazioni a frequenza allelica inferiore all'1% sono frequentemente descritte in pazienti anche con neoplasie avanzate.


Lo sviluppo di nuove tecniche di *NGS* con incrementata sensibilità ha consentito di superare questo limite. Attualmente, le tecnologie basate su *NGS* sono in grado di rilevare *MAF* <1%. Inoltre, molti metodi, come quelli basati su identificatori molecolari univoci o su codici a barre univoci, possono aiutare ad aumentare la sensibilità e ridurre i falsi negativi. Questi metodi, quando impiegati su ctDNA, sono in grado di raggiungere sensibilità che variano dallo 0.1% allo 0.01% (2). Le tecniche in *NGS* possono essere applicate utilizzando pannelli mirati (*targeted*) per il rilevamento specifico e altamente sensibile delle mutazioni su ctDNA. Tra questi, il *Tagged-Amplicon (TAm-seq)* ad elevata profondità, il sistema di sequenziamento sicuro (*safe-sequencing system, Safe-SeqS*), la profilazione personalizzata CAncer mediante sequenziamento profondo (*CAPP-Seq*) e sistema *AmpliSeq (Ion Torrent)*. La versione avanzata di *TAm-Seq*, denominata *eTAmSeq™*, è in grado di rilevare alterazioni genetiche con *MAF* dello 0.25% con una sensibilità del 94%. Inoltre, è in grado di identificare varianti a singolo nucleotide (*single-nucleotide variant, SNV*), piccole inserzioni/delezioni (*indels*) e varianti di numero di copie (*copy number variation, CNV*). *CAPP-Seq* è in grado di rilevare varianti con *MAF* ~ 0.02% con una sensibilità di quasi il 100% nei pazienti affetti da tumore polmonare non a piccole cellule (*non-small cell lung cancer, NSCLC*) in stadio II-IV. *AmpliSeq* consente il rilevamento di *CNV*, *SNV*, *indels* e geni di fusione con un input di DNA pari a 1 ng. *Safe-SeqS* riduce gli errori di sequenziamento di almeno 70 volte ed ha una sensibilità fino al 98% nel rilevare le mutazioni tumorali.

Alcune di queste tecnologie, quali la *AmpliSeq* e la *SAFE-SeqS*, sono impiegate anche da kit disponibili in commercio, mentre altre sono utilizzate da laboratori indipendenti o da aziende che offrono il servizio di sequenziamento del ctDNA.

Sebbene i pannelli mirati (*targeted*) abbiano il vantaggio di una elevata sensibilità, solo il sequenziamento dell'intero genoma (*whole-genome sequencing, WGS*) ha possibilità di identificare ampie alterazioni di struttura del genoma. Questa applicazione è tuttavia sperimentale e non ancora utilizzabile nella pratica clinica.

Un altro sistema molto promettente è quello chiamato *PARE (Personalized Analysis of Rearranged Ends)* che viene impiegato per identificare i riarrangiamenti su ctDNA. *PARE* utilizza innanzitutto l'analisi di sequenza *NGS* per identificare i riarrangiamenti individuati sul tessuto tumorale: quindi applica la *PCR* per il monitoraggio quantitativo dei riarrangiamenti rilevati. È altamente sensibile nel rilevare mutazioni nel ctDNA < 0.001% nei campioni di plasma di pazienti (3). Alcuni studi hanno suggerito che mutazioni nel ctDNA a livelli > 0,75% potrebbero essere rilevate in pazienti oncologici con sensibilità > 90% e specificità > 99%. Anche una singola copia di riarrangiamento nel ctDNA potrebbe infatti essere rilevata senza falsi positivi con tale metodologia (3).

Sono attualmente disponibili molti pannelli *NGS* dedicati all'analisi del ctDNA. Alcuni si limitano ad analizzare poche decine di geni, altri arrivano anche a coprire mutazioni in oltre 500 geni. Quasi tutti i pannelli analizzano solo ctDNA, ma esistono anche pannelli che prevedono la analisi sia del DNA che dell'RNA circolante. In particolare, l'RNA viene preferito al DNA per il sequenziamento delle fusioni geniche e di altre alterazioni difficili da individuare a livello di DNA (ad esempio, la mutazione *skipping* dell'esone 14 del gene *Mesenchymal Epithelial Transition [MET]*).



E' importante sottolineare che, comunque, esistono differenti livelli di sensibilità tra metodi *targeted* e *untargeted*. Rispetto agli approcci mirati in grado di rilevare *MAF* da 0.01% a 0.5%, gli approcci non mirati possono rilevare *MAF* > 10%. Tuttavia, gli approcci *untargeted* non richiedono conoscenze preliminari delle alterazioni di interesse e possono permettere di sviluppare algoritmi predittivi di variazione del numero di copie a livello del genoma o valutare spettri di mutazione (3).

Uno dei principali problemi associato alla analisi del ctDNA con *NGS* è rappresentato dalla possibilità di falsi positivi dovuti ad artefatti di sequenza, che sono relativamente frequenti per varianti a bassa frequenza allelica (4). Una serie di accorgimenti è stata adottata nelle nuove tecnologie di sequenziamento per risolvere la problematica degli artefatti. In particolare, l'utilizzo di *barcodes* molecolari, definiti anche *unique molecular identifiers (UMI)*, associato a *pipelines* bioinformatiche dedicate, consente in molti casi di ridurre in maniera significativa il tasso di falsi positivi.

Ai laboratori che vogliono adottare pannelli di *NGS* per la analisi del ctDNA, viene pertanto raccomandato di:


- utilizzare per l'analisi del ctDNA pannelli *NGS* specifici per questo approccio e per i quali sia stata effettuata una adeguata validazione;
- effettuare, in caso di utilizzo di pannelli commerciali già validati, una verifica per garantire che la performance del pannello sia riprodotta utilizzando la tipologia di campioni che vengono analizzati nella routine diagnostica (5);
- partecipare a controlli di qualità esterna per validare il nuovo percorso diagnostico adottato.

La comparazione dei dati di sequenziamento mediante *NGS* di tessuto e ctDNA spesso dimostra un basso livello di concordanza (6), mentre studi recenti dimostrano una concordanza di circa il 97% tra le mutazioni identificate nelle biopsie delle metastasi e il ctDNA (7).

Al netto degli artefatti di sequenza, tale discordanza può essere dovuta alla eterogeneità tumorale oppure a mutazioni associate ad emopoiesi clonale. La frequenza di mutazioni associate ad emopoiesi clonale aumenta con l'età e la possibilità di individuarle con un test *NGS* su cfDNA è funzione della sensibilità della tecnologia utilizzata (8). La maggior parte delle mutazioni associate ad emopoiesi clonale avviene in geni coinvolti in sindromi mielodisplastiche e/o processi di leucemogenesi. Tuttavia, sono state descritte mutazioni anche in altri geni tra cui *KRAS (Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog)* (9). Non essendo al momento possibile distinguere tra mutazioni associate a ctDNA o piuttosto ad emopoiesi clonale, si suggerisce di isolare e conservare la frazione di cellule mononucleate (*peripheral blood leukocytes, PBL*) all'atto della separazione del plasma. L'analisi del DNA estratto da *PBL* potrà consentire di stabilire la origine di una eventuale variante, qualora il quesito avesse rilevanza clinica.

## **Bibliografia**

1. Rachiglio A M, Abate R E, Sacco A et al. Limits and Potential of Targeted Sequencing Analysis of Liquid Biopsy in Patients With Lung and Colon Carcinoma. *Oncotarget*. 2016 Oct 11;7(41):66595-66605.
2. Abate R E, Pasquale R, Fenizia F et al. The role of circulating free DNA in the management of NSCLC. *Expert Review of Anticancer Therapy*. 2019;19:1, 19-28
3. Chen M, Zhao H. Next-generation sequencing in liquid biopsy: cancer screening and early detection. *Hum Genomics* 2019;13, 34.
4. Stetson D, Ahmed A, Xu X et al. Orthogonal Comparison of Four Plasma NGS Tests With Tumor Suggests Technical Factors are a Major Source of Assay Discordance. *JCO Precision Oncology* 2019.


- 
5. Pasquale R, Forgione L, Roma C et al. Targeted sequencing analysis of cell-free DNA from metastatic non-small-cell lung cancer patients: clinical and biological implications. *TLCR* 2020; doi: 10.21037/tlcr.2020.01.01.
  6. Agarwal N, Lanman R B; Pal, S K et al. Regarding the Congruence Between 2 Circulating Tumor DNA Sequencing Assays. *JAMA Oncol.* 2018;4(10):1429-1430.
  7. Lebofsky R, Decraene C, Bernard V et al. Circulating Tumor DNA as a Non-Invasive Substitute to Metastasis Biopsy for Tumor Genotyping and Personalized Medicine in a Prospective Trial Across All Tumor Types. *Mol Oncol.* 2015;9(4):783-90.
  8. Watson C J, Papula A L, Poon G Y P et al. The evolutionary dynamics and fitness landscape of clonal hematopoiesis. *Science* 2020; 367 (6485): 1449-1454.
  9. Hu Y, Ulrich B, Supplee J et al. False positive plasma genotyping due to clonal hematopoiesis. *Clin Cancer Res* 2018; doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-0143.

## ***5. Applicazioni della biopsia liquida (ctDNA) in pratica clinica***

### ***5.1. Non-small cell lung cancer (NSCLC)***

Nella corrente pratica clinica, la biopsia liquida è al momento principalmente utilizzata per l'analisi dello stato mutazionale del gene *EGFR* in pazienti con *NSCLC* in stadio avanzato. La fase pre-analitica, ovvero la valutazione iniziale dell'adeguatezza del campione, rappresenta in questo *setting* un momento cruciale per la determinazione di un biomarcatore predittivo di risposta ad un trattamento farmacologico mirato. In considerazione del numero sempre crescente di marcatori da valutare a fini diagnostici, prognostici e terapeutici, la gestione del materiale biologico risulta critica non solo al momento della prima diagnosi di malattia avanzata, ma anche in caso di progressione di malattia, dove il concetto di "re-biopsia" appare spesso la strategia migliore per la gestione clinica del paziente affetto da *NSCLC* avanzato. Come evidenziato da molteplici studi e meta-analisi, nella pratica clinica ci sono particolari situazioni in cui è possibile utilizzare altri campioni biologici oltre quello tessutale (quale il sangue periferico) per l'identificazione di eventuali biomarcatori predittivi di risposta a terapie a bersaglio molecolare. In particolare, la determinazione dello stato mutazionale del gene *EGFR* su ctDNA estratto da plasma può essere eseguita: (i) nei casi in cui il campione cito-istologico in esame non contenga una quantità e/o qualità di cellule neoplastiche vitali sufficienti per le analisi molecolari previste; o (ii) nei casi in cui sia impossibile ottenere un campione di materiale tessutale (istologico o citologico) per condizioni avverse al campionamento legate alla tecnica (quantità, qualità) e/o alle condizioni generali del paziente.

Alla luce della concordanza diagnostica delle analisi condotte su ctDNA e tessuto per la valutazione dello stato mutazionale di *EGFR*, la biopsia liquida è attualmente raccomandata come possibile alternativa all'analisi su tessuto tumorale in due scenari clinici: 1) nei pazienti con nuova diagnosi di *NSCLC* avanzato e prima di iniziare qualsiasi tipo di trattamento ("al basale"), in cui la quantità e/o qualità del tessuto disponibile non siano sufficienti per effettuare le analisi molecolari previste o nei quali l'analisi molecolare su tessuto sia risultata inadeguata; 2) nei pazienti *EGFR*-mutati in progressione a terapia di prima linea con inibitori del dominio tirosin-chinasico (*tyrosine kinase inhibitor, TKI*) di *EGFR* di prima o seconda generazione ("alla comparsa della progressione") per la ricerca della mutazione di resistenza p.T790M nell'esone 20 di *EGFR*, al fine di indirizzare ad un trattamento con *TKI* di terza generazione.



Contrariamente ad *EGFR*, la valutazione mediante biopsia liquida dello stato mutazionale del gene *V-Raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B (BRAF)*, dei riarrangiamenti dei geni *Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK)* e *ROS Proto-Oncogene 1, Receptor Tyrosine Kinase (ROS1)*, e di altre alterazioni geniche che conferiscono sensibilità e/o resistenza a trattamenti a bersaglio molecolare (riarrangiamenti dei geni *Rearranged During Transfection [RET]* ed *Neurotrophic Receptor Tyrosine Kinase [NTRK] 1-3*, mutazione *exon skipping* a livello dell'esone 14 di *MET*, amplificazioni di *MET* e *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 [HER2]*, mutazione p.G12C dell'esone 2 del gene *KRAS*) sono da ritenersi procedure non ancora approvate in pratica clinica e quindi restano test da effettuare ancora nell'ambito di studi clinici. Tuttavia, data la mole di evidenze scientifiche riportate in letteratura a supporto dell'analisi di alterazioni a carico del ctDNA in integrazione a quanto già disponibile per quanto riguarda il DNA estratto da campioni tissutali, in casi selezionati e discussi all'interno dei gruppi multidisciplinari è raccomandabile l'utilizzo delle procedure di cui sopra anche al di fuori di studi clinici, ma per esigenze cliniche opportunamente identificate.

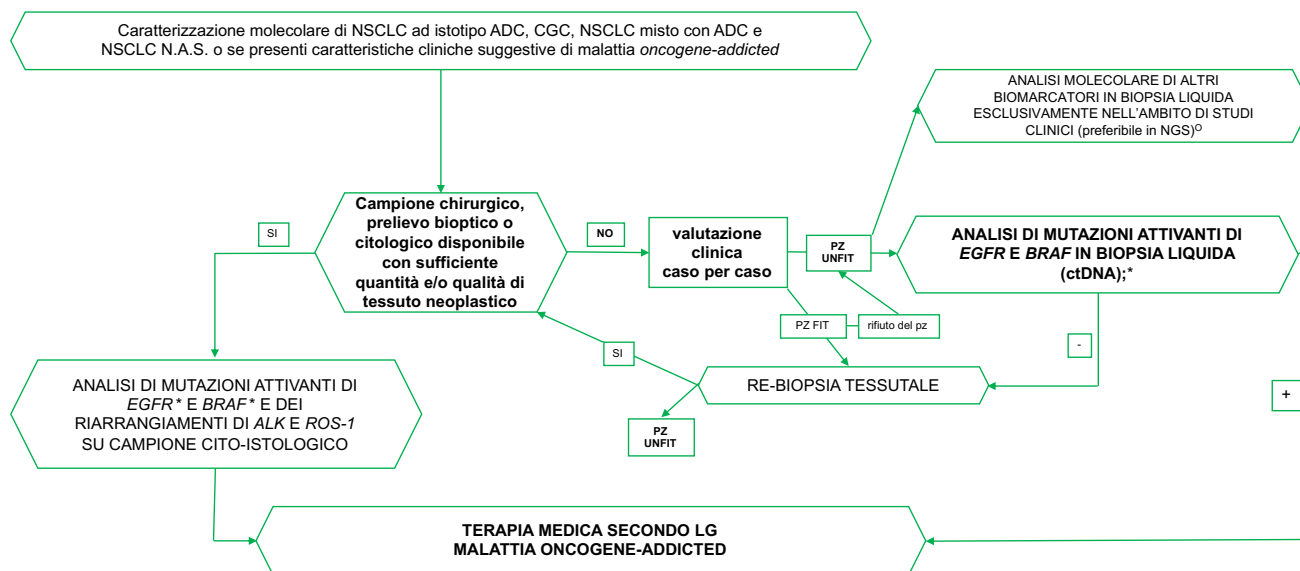
#### **5.1.1. Pazienti affetti da NSCLC avanzato non pre-trattato**

L'analisi del ctDNA estratto da plasma può essere considerata una valida alternativa all'analisi del campione cito-istologico per la sola determinazione dello stato mutazionale di *EGFR* in tutti quei pazienti *NSCLC* in cui, dopo opportuna diagnosi morfologica e di malattia in stadio avanzato, la qualità e/o quantità del campione tissutale sia scarsa o non disponibile per portare a termine le analisi molecolari previste, oppure sia stata condotta su tessuto ma risulti inadeguata. Tuttavia, in caso di risultato negativo su plasma (assenza di mutazioni attivanti di *EGFR*), in considerazione del tasso di falsi negativi spesso dipendente dalla quantità di DNA rilasciata nel sangue dal tumore, è indicato un ulteriore prelievo bioptico per permettere la definizione dell'assetto molecolare, laddove questo sia clinicamente possibile e accettato dal paziente. Pertanto, la determinazione di marcatori predittivi di risposta al trattamento rimane raccomandata su tessuto neoplastico, con l'utilizzo della biopsia liquida laddove non sia possibile l'utilizzo della biopsia tissutale per condizioni legate alla tecnica (quantità, qualità) e/o al paziente.

Per quanto riguarda la tecnologia biomolecolare da utilizzare per la valutazione *upfront* dello stato mutazionale di *EGFR* a partire da ctDNA, l'impiego della *NGS*, implementato in centri preparati alla gestione del campione, risulta preferibile rispetto alle tecnologie tradizionali in considerazione della maggiore specificità e sensibilità della metodica. Le procedure diagnostiche come la *RT-PCR* o la *ddPCR* rappresentano validi strumenti dotati di elevata sensibilità, talvolta poco specifici e con un tempo di completamento (*turnaround time* o *TAT*) breve. Il limite principale di queste metodiche risiede nella capacità di identificare solo mutazioni note (utilizzo di sonde specifiche). Le piattaforme *NGS* hanno sicuramente il vantaggio di poter analizzare uno spettro di mutazioni (*reference range*) più ampio e sono strumenti affidabili e da preferire sia per la loro sensibilità che specificità, anche se il *TAT* e la necessità di adeguato *expertise* rendono tale procedura ancora poco diffusa.



### Paziente NSCLC metastatico *oncogene-addicted* non pre-trattato



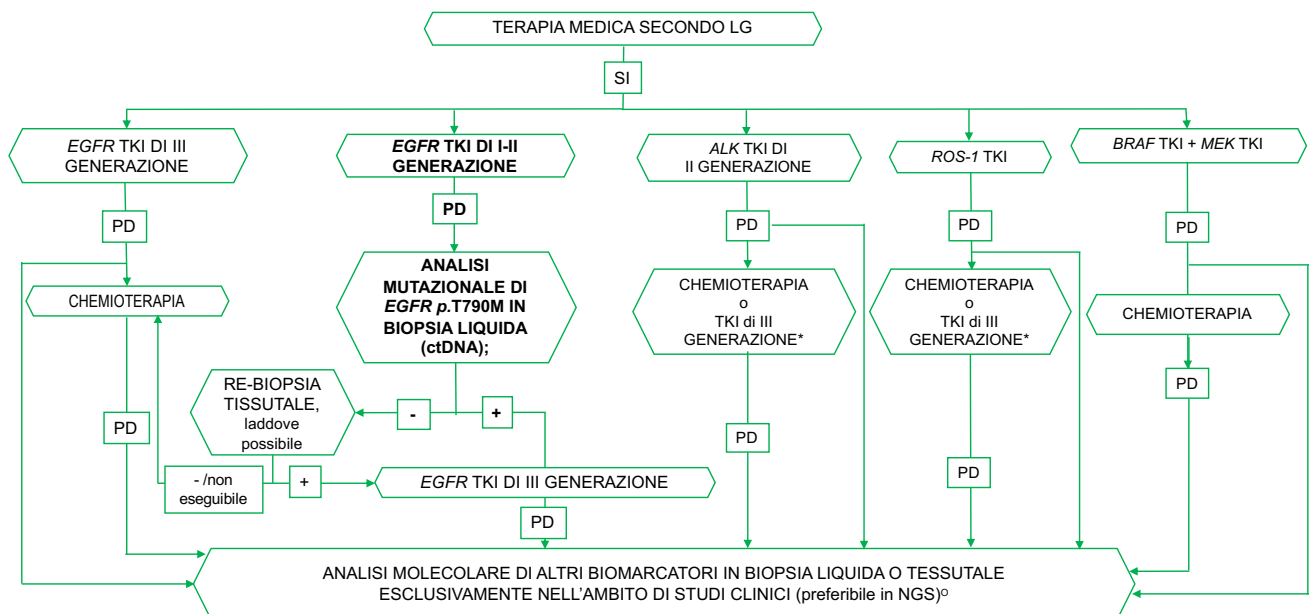
\*mutazioni puntiformi dell'esone 18, delezioni dell'esone19, mutazioni puntiformi dell'esone 20 e 21 del gene *EGFR* ; mutazioni p.V600 del gene *BRAF*  
 °riarrangiamenti di *ALK* , *ROS-1*, *RET*, *NTRK*; amplificazione e mutazione *exon skipping* di *MET*, amplificazione di *HER-2*, mutazione p.G12C del gene *KRAS*

### 5.1.2. Pazienti affetti da NSCLC avanzato pre-trattato con TKI

Tutti i pazienti *EGFR* mutati in progressione a terapia di prima linea con *TKI* di *EGFR* di prima o seconda generazione (gefitinib, erlotinib o afatinib), dovrebbero essere sottoposti ad analisi mutazionale per la ricerca del principale meccanismo di resistenza, la mutazione p.T790M a carico dell'esone 20 di *EGFR*. Considerata l'elevata accuratezza diagnostica dell'analisi condotta su ctDNA e viste le condizioni spesso precarie di questi pazienti, è ragionevole effettuare in prima battuta la ricerca della mutazione p.T790M su biopsia liquida (preferibilmente mediante *ddPCR* o *RT-PCR*). In caso di risultato positivo, un trattamento con un *TKI* di III generazione (osimertinib) dovrebbe essere preso in considerazione come opzione terapeutica di prima scelta; in caso di esito negativo su biopsia liquida invece, è sempre necessario procedere al test con *ddPCR* (o *NGS*) su tessuto tumorale prelevato mediante nuova biopsia, laddove clinicamente possibile e accettato dal paziente. Più recentemente, alla luce dei tassi di sopravvivenza globale dello studio FLAURA, osimertinib è stato approvato in Italia anche per la prima linea di trattamento del paziente *NSCLC* avanzato con mutazioni attivanti del gene *EGFR*. In considerazione dell'attività inibitoria di questo *TKI* di terza generazione sia a livello delle mutazioni sensibilizzanti di *EGFR* sia a livello della p.T790M, la ricerca su biopsia liquida e/o tissutale della mutazione di resistenza in seguito a progressione di malattia da *TKI* di terza generazione diventa un'opzione secondaria. Dopo aver esaurito le possibilità di trattamento con farmaci a bersaglio molecolare, i pazienti i cui tumori presentano una mutazione di *EGFR* sono candidati a chemioterapia secondo gli schemi utilizzati nell'istologia non-squamosa.

Altri meccanismi di resistenza agli inibitori di *EGFR* (amplificazioni di *MET* e di *HER2*, ulteriori mutazioni a carico di *EGFR*), agli inibitori di *ALK* (mutazioni puntiformi di *ALK* o up-regolazione di altri oncogeni), agli inibitori di *ROS1* o agli inibitori di *BRAF* e *MEK* possono essere studiati su biopsia liquida e/o tissutale e trattati sulla base del meccanismo biologico responsabile dello sviluppo della resistenza nell'ambito di studi clinici. Come precedentemente riportato, data la mole di evidenze scientifiche riportate in letteratura a supporto dell'analisi di alterazioni a carico del ctDNA in integrazione a quanto già disponibile per quanto riguarda il DNA estratto da campioni tissutali, in casi selezionati e discussi all'interno dei gruppi multidisciplinari è raccomandabile l'utilizzo delle procedure di cui sopra anche al di fuori di studi clinici, ma per esigenze cliniche opportunamente identificate.

#### Paziente NSCLC metastatico *oncogene-addicted* pre-trattato con TKI



\*in atto non approvati e rimborsati in Italia: utilizzo consentito in programmi ad utilizzo nominale del farmaco o in studi clinici


°mutazioni acquisite di *EGFR*, amplificazione di *MET*, amplificazione di *HER-2*, mutazioni del pathway *RAS-MAPK*, amplificazione o mutazioni puntiformi di *PI3K*, nuovi riarrangiamenti genici

## 6. Applicazioni cliniche emergenti

Lo sviluppo di tecnologie di NGS per lo studio del ctDNA ha notevolmente ampliato le possibilità di applicazione clinica della biopsia liquida.

La disponibilità di ampi pannelli genici consente di poter ottenere un completo profilo genomico della neoplasia anche a partire dai pochi nanogrammi di cfDNA che di solito possono essere estratti dal sangue periferico. Numerosi studi hanno dimostrato che il profilo genetico derivato dall'analisi del cfDNA è simile a quello che si ottiene dall'analisi del DNA tumorale tissutale soprattutto nel carcinoma del polmone, anche se non mancano ormai applicazioni a quasi tutte le neoplasie (1-4). In particolare, è stato evidenziato in diverse pubblicazioni la possibilità di identificare con NGS diverse tipologie di alterazioni genetiche anche analizzando il ctDNA, con tassi di risposte ai trattamenti target simili a quelli rilevati per alterazioni genetiche identificate mediante analisi del tessuto





tumorale (5). Pertanto, alla luce di queste evidenze scientifiche, l'analisi del ctDNA con *NGS* può rappresentare un approccio alternativo per l'identificazione di mutazioni *driver* nelle neoplasie umane nonché di marcatori complessi come l'instabilità dei microsatelliti (*microsatellite instability, MSI*) o il *tumor mutational burden (TMB)*. Il ricorso alla biopsia liquida deve però essere preso in considerazione solo in caso di non disponibilità di tessuto tumorale. Infatti, le possibilità di successo dell'analisi della biopsia liquida sono legate alla quantità di ctDNA presente nel sangue periferico, che possono limitare in maniera significativa la sensibilità del test. Un ulteriore limite all'impiego di questo approccio può essere inoltre rappresentato da assenza di studi specifici effettuati con biopsia liquida e quindi dall'impossibilità di prescrizione del farmaco.

Nel caso delle fusioni geniche, devono essere poi valutate anche le limitazioni tecniche legate alla analisi del DNA. Soprattutto per fusioni complesse, come quelle di *NTRK (Neurotrophic Receptor Tyrosine Kinase)* caratterizzate da larghe regioni introniche o quelle di *FGFR (Fibroblast Growth Factor Receptor)* che presentano molteplici partner, le possibilità di identificazione mediante analisi del ctDNA sono limitate e, pertanto, questa analisi potrebbe dare dei falsi negativi. La possibilità di identificare fusioni geniche è in genere maggiore analizzando l'RNA. Tuttavia, la ridotta stabilità dell'RNA circolante limita le possibilità di successo di questo approccio.


Inoltre, deve essere sottolineato che ogni pannello/metodica di *NGS* ha i propri livelli di sensibilità e di specificità che possono variare in maniera significativa. Pertanto, i risultati ottenuti con uno specifico pannello non possono essere generalizzati. Ogni pannello deve essere sottoposto ad una necessaria fase di validazione e/o verifica per determinare la sua affidabilità ed i suoi limiti.

Infine, la possibilità di analizzare ampie regioni genomiche con la *NGS* ha ampliato notevolmente l'utilizzo della biopsia liquida per lo studio dei meccanismi di resistenza ai farmaci biologici (6-8). Ad esempio, grazie alla analisi con *NGS* della biopsia liquida sono stati scoperti molti dei meccanismi di resistenza agli inibitori tirosinchinasici di nuova generazione nel tumore del polmone come pure le mutazioni di reversione di *BRCA* in pazienti con carcinoma ovarico trattate con inibitori di PARP (Poli ADP-ribosio polimerasi). Questi approcci devono essere in qualche modo considerati sperimentali, in quanto non sono disponibili al momento terapie specifiche per queste alterazioni nella pratica clinica. È innegabile, tuttavia, che la acquisizione di queste informazioni può favorire la personalizzazione dei trattamenti e l'eventuale arruolamento in studi clinici. Pertanto, seppur non indicato nella pratica clinica, l'impiego del test *NGS* su biopsia liquida per lo studio della resistenza in pazienti trattati con farmaci biologici può sicuramente fornire informazioni rilevanti in centri accademici che abbiano a disposizione un ampio numero di *trials* clinici.

Vista la complessità dei dati che derivano da ampi pannelli genici e la necessità di una loro corretta interpretazione nel contesto dello scenario clinico, si raccomanda che i risultati di test *NGS* effettuati con pannelli ampi siano discussi nell'ambito dei *Molecular Tumor Boards (MTBs)*.

#### **Bibliografia:**

1. Mack C P, Banks K C, Espenschied C R et al. Spectrum of driver mutations and clinical impact of circulating tumor DNA analysis in non-small cell lung cancer: Analysis of over 8000 cases. *Cancer*. 2020; 126 (14) 3219-3228.
2. Remon J, Lacroix L, Jovelet C et al. Real-World Utility of an Amplicon-Based Next-Generation Sequencing Liquid Biopsy for Broad Molecular Profiling in Patients With Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *JCO Precision Oncology*. 2019; doi: 10.1200/PO.18.00211.


- 
3. Sabari J K, Offin M, Stephens D et al. A Prospective Study of Circulating Tumor DNA to Guide Matched Targeted Therapy in Lung Cancers. JNCI J Natl Cancer Inst. 2019; doi: 10.1093/jnci/djy156.
  4. Kato S, Schwaederlé M C, Fanta P T et al. Genomic Assessment of Blood-Derived Circulating Tumor DNA in Patients With Colorectal Cancers: Correlation With Tissue Sequencing, Therapeutic Response, and Survival. JCO Precision Oncology. 2019; doi: 10.1200/PO.18.00158.
  5. Aggarwal C, Thompson JC, Black TA et al. Clinical Implications of Plasma-Based Genotyping With the Delivery of Personalized Therapy in Metastatic Non–Small Cell Lung Cancer. JAMA Oncol. 2019;5(2):173–180.
  6. Kilgour E, Rothwell D G, Brady G et al. Liquid Biopsy-Based Biomarkers of Treatment Response and Resistance. Cancer Cell 2020;37 (4): 485-495
  7. Parikh A R, Leshchiner I, Elagina L et al. Liquid Versus Tissue Biopsy for Detecting Acquired Resistance and Tumor Heterogeneity in Gastrointestinal Cancers. Nat Med 2019 Sep;25(9):1415-1421.
  8. Lin K K, Harrell M I, Oza A M et al. BRCA Reversion Mutations in Circulating Tumor DNA Predict Primary and Acquired Resistance to the PARP Inhibitor Rucaparib in High-Grade Ovarian Carcinoma. Cancer Discov 2019; doi: 10.1158/2159-8290.CD-18-0715

### **6.1. Carcinoma del colon-retto (CCR)**

Le applicazioni della biopsia liquida per rilevazione di ctDNA nel carcinoma del colon-retto (CCR) sono un campo emergente di ricerca e riguardano prevalentemente: a) la malattia in stadio iniziale per una valutazione prognostica e quindi sulla base del rischio definito personalizzare la scelta della terapia adiuvante, e b) la malattia in stadio avanzato per l'analisi di mutazioni *RAS* e *BRAF* e il monitoraggio delle terapie a bersaglio molecolare.

*Malattia in stadio I-III* - La possibilità di utilizzare il ctDNA quale *marker* di malattia minima residua (MMR), mediante la ricerca in circolo di mutazioni specifiche somatiche presenti nel tessuto o attraverso approcci agnostici come la valutazione dei marcatori di metilazione, è diventato un settore emergente della ricerca clinica per il CCR localizzato. In questo ambito è stata già osservata una correlazione tra la presenza ctDNA dopo rimozione chirurgica del tumore primario e la recidiva della malattia, sia in stadio II che III (1-4) ed è emerso come, nel caso di analisi di mutazioni somatiche, la ricerca di più di una variante e l'utilizzo di prelievi seriati aumenti l'accuratezza nel predire la presenza di MMR (4). I dati attualmente disponibili sono provenienti da serie eterogenee, molto spesso con un limitato numero di pazienti, non sempre trattati con i regimi chemioterapici adiuvanti attualmente standard, e manca una contestualizzazione rispetto ad altri *markers* clinici, immunologici e molecolari che permetta di gerarchizzare l'importanza di questa determinazione rispetto ad altre standard o emergenti (es. *immunoscore*, *CDX-2*, *MSI*). **Questa applicazione della biopsia liquida per la malattia in stadio iniziale, pertanto, è da ritenersi ancora sperimentale.**

*Malattia in stadio IV* - Numerosi studi hanno dimostrato la fattibilità di eseguire il test *RAS* su biopsia liquida come potenziale sostituto dell'analisi su tessuto tumorale nel CCR metastatico. La concordanza tra i due approcci con le attuali tecniche di sequenziamento varia dal 60 all'80% (5), anche se bisogna considerare che il tumore e il sangue periferico sono due tessuti distinti e pertanto non è ragionevole attendersi una concordanza perfetta e che le discrepanze osservate in termini di specificità – assumendo il tessuto tumorale come riferimento – trovano giustificazione nel fatto che la biopsia liquida è in grado di superare l'eterogeneità spaziale e temporale che limitano l'analisi



tissutale. Certamente la biopsia liquida offre i vantaggi di un approccio relativamente non invasivo e più duttile, sia per la possibilità di effettuare più facilmente la determinazione dello stato mutazionale in base al momento esatto dell'intervento terapeutico con anti-*EGFR*, sia per il ridotto *TAT*. Tuttavia, alcune considerazioni limitano l'utilizzo nella clinica della biopsia liquida per ricerca di ctDNA quale sostituto per l'analisi mutazionale di *RAS* ai fini dell'esclusione dalla terapia con cetuximab e panitumumab. Quest'analisi non è ancora controllata in generale da programmi di controllo di qualità esterna (*External quality assessment [EQA] schemes*), come quelli messi in atto per l'analisi tissutale, e non esistono sufficienti evidenze cliniche per stabilire in termini quantitativi quale sia la soglia percentuale di alleli *RAS* mutati determinata su sangue periferico che conferisca resistenza alla terapia con anti-*EGFR*, visto che la conoscenza attuale si basa su analisi svolte su tessuto tumorale nei trial clinici registrativi. Pertanto, data la mole di evidenze scientifiche riportate in letteratura a supporto dell'analisi di alterazioni a carico del ctDNA in integrazione a quanto già disponibile per quanto riguarda il DNA estratto da campioni tissutali, in casi selezionati e discussi all'interno dei gruppi multidisciplinari è raccomandabile l'utilizzo delle procedure di cui sopra anche al di fuori di studi clinici, ma per esigenze cliniche opportunamente identificate.

#### **Bibliografia**


1. Tie J, Wang Y, Tomasetti C et al. Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer. *Sci Transl Med* 2016; 8(346): 346ra92.
2. Reinert T, Henriksen TV, Christensen E et al. Analysis of plasma cell-free DNA by ultradeep sequencing in patients with stages I to III colorectal cancer. *JAMA Oncol* 2019; 5(8): 1124
3. Taieb J, Taly V, Vernerey D, ANALYSIS OF CIRCULATING TUMOR DNA (CTDNA) FROM PATIENTS ENROLLED IN THE IDEA-FRANCE PHASE III TRIAL: PROGNOSTIC AND PREDICTIVE VALUE FOR ADJUVANT TREATMENT DURATION. *Annals of Oncology* (2019) 30 (suppl\_5): v851-v934. 10.1093/annonc/mdz394
4. Tarazona N, Gimeno-Valiente F, Gambardella V, et al. Targeted next-generation sequencing of circulating-tumor DNA for tracking minimal residual disease in localized colon cancer *Ann Oncol.* 2019; 30(11):1804-1812.
5. Normanno N, Cervantes A, Ciardiello F, et al: The liquid biopsy in the management of colorectal cancer patient: current applications and future scenarios. *Cancer Treat Rev* 2018; 70: 1-8

## **6.2 Carcinoma della mammella**

Il tumore della mammella è caratterizzato da un elevato livello di eterogeneità molecolare, che vede la presenza di cloni cellulari portatori di differenti alterazioni geniche che ne guidano la crescita e la proliferazione. La presenza di alterazioni molecolari rende, in alcuni casi, il tumore responsivo ad un trattamento, ma, la co-presenza di cloni cellulari portatori di altre mutazioni, fa sì che durante il trattamento vengano selezionati cloni minoritari, ma resistenti alla terapia, della quale ne determineranno il fallimento (1).

Numerosi studi hanno dimostrato una possibile utilità clinica della biopsia liquida nelle pazienti affette da tumore della mammella, sia nell'identificazione di biomarcatori predittivi di risposta o resistenza al trattamento, sia come monitoraggio quantitativo del ctDNA durante il trattamento stesso (2-6).

In particolare, analisi in biopsia liquida di geni frequentemente mutati nel tumore della mammella (i.e. *Estrogen Receptor 1 [ESR1]*, *PhosphoInositide 3-kinase [PI3K]*, *tumor protein p53 [p53]*) sono



state associate anche alla valutazione del carico tumorale all'identificazione ed al monitoraggio della malattia residua in pazienti sottoposte ad intervento chirurgico (7), e come significativo fattore prognostico (8).

Recentemente è stato dimostrato che mutazioni a carico del gene *ESR1* hanno un ruolo predittivo di resistenza al trattamento con CDK4/6 inibitori. In particolare, le mutazioni di *ESR1* sono state analizzate nel ctDNA di 1017 pazienti con tumore della mammella metastatico prima e dopo un mese di trattamento con palbociclib in combinazione ad antiaromatase come prima linea, ed è stato dimostrato che la presenza delle mutazioni riduceva significativamente la *progression free survival* (PFS) al trattamento (*ESR1* wild type vs *ESR1* mut 26.7 vs 11 mesi,  $p < 0.001$ ). Inoltre, nel gruppo di pazienti mutate (3.2%), è stato dimostrato anche che la clearance delle mutazioni di *ESR1* nel ctDNA dopo un mese di trattamento predice una sopravvivenza più lunga, rispetto al gruppo di pazienti che manteneva quantità di mutazione nel ctDNA rilevabili (*ESR1* mut cleared vs *ESR1* mut detected 24.1 vs 7.4 mesi,  $p < 0.001$ ). I risultati finali di questo studio, presentato durante il congresso ASCO 2020, per valutare se lo *screening* delle mutazioni del gene *ESR1* avessero effettivamente validità clinica, saranno riportati nel 2021 (*PADA-1 trial* - NCT03079011) (9).

Il trattamento con alpelisib, inibitore del gene *PIK3CA*, è stato nel 2019 approvato da FDA per il trattamento delle pazienti con tumore della mammella metastatico, *PIK3CA*-mutato. Lo studio registrativo ha infatti dimostrato che il trattamento con alpelisib prolunga la PFS delle pazienti che avevano ricevuto una linea precedente di terapia endocrina (10). In Italia, alpelisib è utilizzabile all'interno di studi clinici, al momento della elaborazione di queste Raccomandazioni.

Alcuni studi hanno dimostrato che l'insorgenza di mutazioni nel gene *PIK3CA* è uno dei meccanismi di resistenza acquisita all'ormonoterapia (11, 12). Per questo motivo, il trattamento con alpelisib, è stato approvato da FDA (*Food and Drug Administration*) sulla base della presenza di mutazioni di *PIK3CA* sia su tessuto (qualora disponibile) che su biopsia liquida.


Il trattamento con l'inibitore di *PI3K* è approvato sulla base della presenza di una delle seguenti mutazioni del gene *PIK3CA*: p.C420R, p.E542K, p.E545A, p.E545D, p.E545G, p.E545K, p.Q546E, p.Q546R, p.H1047L, p.H1047R, p.H1047Y.

Benchè approcci tecnologici come l'*NGS*, consentano un migliore studio della eterogeneità clonale della malattia permettendo l'identificazione di molteplici biomarcatori ed una valutazione della evoluzione molecolare neoplastica durante il *follow-up* clinico, questi restano, ad ora, raccomandati solo all'interno di studi clinici.

In conclusione, per quanto riguarda il tumore della mammella, è verosimile che l'analisi su plasma delle mutazioni del gene *PIK3CA*, sarà a breve raccomandata in pratica clinica.

#### **Bibliografia**

1. Kalinowski L, Saunus JM, McCart Reed AE, Lakhani SR. Breast Cancer Heterogeneity in Primary and Metastatic Disease. *Adv Exp Med Biol* 2019; 1152: 75-104.
2. O'Leary B, Hrebien S, Morden JP et al. Early circulating tumor DNA dynamics and clonal selection with palbociclib and fulvestrant for breast cancer. *Nat Commun* 2018; 9: 896.
3. Alimirzaie S, Bagherzadeh M, Akbari MR. Liquid biopsy in breast cancer: A comprehensive review. *Clin Genet* 2019; 95: 643-660.
4. Majure M, Logan AC. What the blood knows: interrogating circulating tumor DNA to predict progression of minimal residual disease in early breast cancer. *Ann Transl Med* 2016; 4: 543.

- 
5. Wang P, Bahreini A, Gyanchandani R et al. Sensitive Detection of Mono- and Polyclonal ESR1 Mutations in Primary Tumors, Metastatic Lesions, and Cell-Free DNA of Breast Cancer Patients. *Clin Cancer Res* 2016; 22: 1130-1137.
  6. Beije N, Sieuwerts AM, Kraan J et al. Estrogen receptor mutations and splice variants determined in liquid biopsies from metastatic breast cancer patients. *Mol Oncol* 2018; 12: 48-57.
  7. Zhou Y, Xu Y, Gong Y et al. Clinical factors associated with circulating tumor DNA (ctDNA) in primary breast cancer. *Mol Oncol* 2019; 13: 1033-1046.
  8. Lee JH, Jeong H, Choi JW et al. Liquid biopsy prediction of axillary lymph node metastasis, cancer recurrence, and patient survival in breast cancer: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 2018; 97: e12862.
  9. Bidard FC, Pistilli B, Dalenc F, et al. Circulating ESR1 mutation detection rate and early decrease under first line aromatase inhibitor and palbociclib in the PADA-1 trial (UCBG-GINECO). DOI: 10.1158/1538-7445.SABCS18-PD2-06.
  10. Andre F, Ciruelos E, Rubovszky G et al. Alpelisib for PIK3CA-Mutated, Hormone Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med* 2019; 380: 1929-1940.
  11. Ma CX, Crowder RJ, Ellis MJ. Importance of PI3-kinase pathway in response/resistance to aromatase inhibitors. *Steroids* 2011; 76: 750-752.
  12. Araki K, Miyoshi Y. Mechanism of resistance to endocrine therapy in breast cancer: the important role of PI3K/Akt/mTOR in estrogen receptor-positive, HER2-negative breast cancer. *Breast Cancer* 2018; 25: 392-401.

### 6.3. Melanoma

Numerosi studi hanno dimostrato una possibile utilità clinica della biopsia liquida nei pazienti affetti da melanoma, sia nell'identificazione delle mutazioni di *BRAF* e di *NRAS* per impostare il trattamento (qualora non sia disponibile il tessuto), sia come monitoraggio quantitativo del ctDNA durante il trattamento stesso (1-5).


In particolare, le analisi delle mutazioni nei geni *BRAF* e/o *NRAS* nel ctDNA tramite metodiche di *RT-PCR* o *ddPCR* sono state associate alla valutazione del carico tumorale (6), all'identificazione della MMR in pazienti sottoposti ad intervento chirurgico radicale (7), e come significativo fattore prognostico in pazienti affetti da melanoma in stadio II/III (8-10) o con malattia metastatica (6). Inoltre, l'analisi del ctDNA è stata proposta come utile biomarcatore della risposta alla terapia con inibitori delle chinasi o con immunoterapia, e della comparsa precoce di resistenza al trattamento (11-14).

Come accaduto in altri contesti neoplastici, anche per il melanoma sono stati recentemente introdotti pannelli multigenici di *NGS* per lo studio del ctDNA (15-16). Tale approccio permette di estendere l'analisi della biopsia liquida anche ai casi che non presentano mutazioni in *BRAF/NRAS*. Inoltre, tale metodica consente un migliore studio della eterogeneità clonale in malattia metastatica e permette una valutazione non invasiva della evoluzione molecolare neoplastica durante il *follow-up* clinico.

Oltre allo studio del cfDNA, sono stati proposti altri biomarcatori in biopsia liquida nei pazienti con melanoma. Tra questi, la valutazione della espressione esosomiale di *PD-L1* (*Programmed death-ligand 1*) è risultata marcatore predittivo di risposta alla immunoterapia (17).

Bisogna sottolineare che mutazioni nel gene *BRAF* sono state identificate nel cfDNA dell'1.4% dei pazienti in screening dermatologico (18) e che quindi ulteriori studi sono necessari a determinarne possibili implicazioni diagnostiche al fine di evitare falsi negativi, dovuti al basso carico di malattia,






che si riflette in un minimo rilascio di ctDNA. Infatti, la concordanza tra ctDNA e tessuto aumenta proporzionalmente allo stadio della malattia, salendo al 25-40% circa negli stadi II/III, fino al 70% circa negli stadi IV (8, 10, 19).

Riassumendo, l'utilizzo del ctDNA nel melanoma metastatico si è dimostrato un utile strumento per l'identificazione di biomarcatori predittivi di risposta a *targeted therapy* (*BRAF*, *NRAS*), l'identificazione di biomarcatori predittivi di resistenza a *targeted therapy* (comparsa di *NRAS* durante il trattamento della malattia *BRAF* mutata con TKI), monitoraggio durante il trattamento con *targeted therapy* e con immunoterapia (8, 12, 19, 20). Tuttavia, data la mole di evidenze scientifiche riportate in letteratura a supporto dell'analisi di alterazioni a carico del ctDNA in integrazione a quanto già disponibile per quanto riguarda il DNA estratto da campioni tissutali, in casi selezionati e discussi all'interno dei gruppi multidisciplinari è raccomandabile l'utilizzo delle procedure di cui sopra anche al di fuori di studi clinici, ma per esigenze cliniche opportunamente identificate.

#### **Bibliografia**

1. Boyer M, Cayrefourcq L, Dereure O et al. Clinical Relevance of Liquid Biopsy in Melanoma and Merkel Cell Carcinoma. *Cancers (Basel)* 2020;12(4)
2. Syeda MM, Wiggins JM, Corless B et al. Validation of Circulating Tumor DNA Assays for Detection of Metastatic Melanoma. *Methods Mol Biol* 2020;2055:155-80
3. Diefenbach RJ, Lee JH, Rizos H. Monitoring Melanoma Using Circulating Free DNA. *Am J Clin Dermatol* 2019;20(1):1-12
4. Pinzani P, Salvianti F, Zaccara S, et al. Circulating cell-free DNA in plasma of melanoma patients: qualitative and quantitative considerations. *Clin Chim Acta* 2011;412(23-24):2141-5
5. Herbreteau G, Charpentier S, Vallee A et al. Use of circulating tumoral DNA to guide treatment for metastatic melanoma. *Pharmacogenomics* 2019;20(18):1259-70 |.
6. Santiago-Walker A, Gagnon R, Mazumdar J, et al. Correlation of BRAF Mutation Status in Circulating-Free DNA and Tumor and Association with Clinical Outcome across Four BRAFi and MEKi Clinical Trials. *Clin Cancer Res* 2016;22(3):567-74
7. Rowe SP, Lubner B, Makell M, et al. From validity to clinical utility: the influence of circulating tumor DNA on melanoma patient management in a real-world setting. *Mol Oncol* 2018;12(10):1661-72
8. Lee RJ, Gremel G, Marshall A, et al. Circulating tumor DNA predicts survival in patients with resected high-risk stage II/III melanoma. *Ann Oncol* 2018;29(2):490-96
9. Lee JH, Saw RP, Thompson JF, et al. Pre-operative ctDNA predicts survival in high-risk stage III cutaneous melanoma patients. *Ann Oncol* 2019;30(5):815-22.
10. Tan L, Sandhu S, Lee RJ, et al. Prediction and monitoring of relapse in stage III melanoma using circulating tumor DNA. *Ann Oncol* 2019;30(5):804-14.
11. Gray ES, Rizos H, Reid AL, et al. Circulating tumor DNA to monitor treatment response and detect acquired resistance in patients with metastatic melanoma. *Oncotarget* 2015;6(39):42008-18.
12. Cabel L, Riva F, Servois V, et al. Circulating tumor DNA changes for early monitoring of anti-PD1 immunotherapy: a proof-of-concept study. *Ann Oncol* 2017;28(8):1996-2001
13. Schreuer M, Meersseman G, Van Den Herrewegen S, et al. Quantitative assessment of BRAF V600 mutant circulating cell-free tumor DNA as a tool for therapeutic monitoring in metastatic melanoma patients treated with BRAF/MEK inhibitors. *J Transl Med* 2016;14:95.
14. Gonzalez-Cao M, Mayo de Las Casas C, Jordana Ariza N, et al. Early evolution of BRAFV600 status in the blood of melanoma patients correlates with clinical outcome and identifies patients refractory to therapy. *Melanoma Res* 2018;28(3):195-203
15. Lin SYH, S.K.; Huynh, K.T.; Salomon, M.P.; Chang, S.C.; Marzese, D.M.; Lanman, R.B.; Talasz, A.A.; Hoon, D.S.B. Multiplex Gene Profiling of Cell-Free DNA in Patients With Metastatic Melanoma for Monitoring Disease *JCO Prec Oncol* 2018;2
16. Yang CI, M.A.; Dashner, S.; Xu, W.; Hansen, A.R.; Bedard, P.; Lheureux, S.; Spreafico, A.; Razak, A.A.; Wu, H.-T.; Shchegrova, S.; Liu, Z.A.; Ohashi, P.S.; Torti, D.; Louie, M.; Sethi, H.; Aleshin, A.; Siu, L.L.; Bratman, S.; Pugh, T.J. . Bespoke circulating tumor DNA (ctDNA) analysis as a predictive biomarker in solid tumor patients (pts) treated with single agent pembrolizumab (P). *Ann Oncol* 2019;30:v34

- 
17. Del Re M, Marconcini R, Pasquini G, et al. PD-L1 mRNA expression in plasma-derived exosomes is associated with response to anti-PD-1 antibodies in melanoma and NSCLC. *Br J Cancer* 2018;118(6):820-24
  18. Calbet-Llopart N, Potrony M, Tell-Marti G, et al. Detection of cell-free circulating BRAF(V) (600E) by droplet digital polymerase chain reaction in patients with and without melanoma under dermatological surveillance. *Br J Dermatol* 2020;182(2):382-89
  19. Knuever J, Weiss J, Persa OD, et al. The use of circulating cell-free tumor DNA in routine diagnostics of metastatic melanoma patients. *Sci Rep* 2020;10(1):4940
  20. Varaljai RW-H, K.; Seremet, T.; Diaz, J.M.S.; Nsengimana, J.; Sucker, A.; Griewank, K.; Horn, P.; von Neuhoff, N.; Shannan, B.; Chauvistré, H.; Vogel, F.C.E.; Horn, S.; Becker, J.C.; Newton-Bishop, J.; Stang, A.; Neyns, B.; Weide, B.; Schadendorf, D.; Roesch, A. ctDNA as a noninvasive monitoring tool in metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 2019;37(Issue 15\_suppl):9548

## ***7. Problematiche di Clinical Utility, sostenibilità, accesso al test molecolare e accesso ai farmaci su indicazione biopsia liquida in un SSN universalistico***

Nella valutazione del possibile inserimento di un test molecolare nei LEA (livelli essenziali di assistenza) è opportuno valutarne la possibile validazione in termini di Validità clinica e di Utilità clinica, termini che non sono considerati quali sinonimi.

La “**validità analitica**” è definita infatti, nel nostro ambito di valutazione come: **Abilità di un test di identificare un target molecolare presente nel DNA circolante.**

L “**utilità clinica**”, è definita invece come: **Abilità di un test di guidare una decisione terapeutica che determina un vantaggio in termini di sopravvivenza globale (*overall survival, OS*) e qualità della vita (*quality of life, QOL*).**


La validità clinica e la utilità clinica rappresentano ambiti diversi e presuppongono una validazione prospettica. Se infatti la validità clinica può ricevere validazione interna, per esempio nell’ ambito di uno studio clinico, la validazione dell’ utilità clinica deve avvenire nell’ ambito della dimostrazione prospettica di un valore aggiunto e venire considerate **cost-effective**.

Il **NICE (National Institute for health and care excellence)** ha pubblicato il 18 gennaio 2018 un **Medtech innovation briefing** su test mutazionali di *EGFR* in biopsia liquida per il *NSCLC* localmente avanzato o metastatico (1). Gli esperti consultati nel briefing evidenziavano come possibili benefici la ridotta necessità di re-biopsia, ridotto numero di accessi ospedalieri, un incremento dei pazienti con corretta diagnosi con offerta di trattamento appropriato e diagnosi più precoce.

E’ stata recentemente pubblicato un **Health Technology Assessment (HTA)** dall’ **Ontario Health Quality** (2). Le conclusioni dell’ *HTA* erano che la biopsia liquida identifica una proporzione elevata di pazienti con la mutazione *EGFR* p.T790M offrendo l’ opportunità di un trattamento personalizzato. Va però considerata un **triage test**, da utilizzare e a cui far poi seguire una biopsia tissutale se negativa a causa del basso valore predittivo negativo. La biopsia liquida “*triage*” è più **cost-effective** della biopsia tissutale in prima istanza.

Studi di questo tipo sono assolutamente necessari per future analisi anche in considerazione del mutato scenario determinate dallo studio FLAURA con l’ approvazione di osimertinib in prima linea di trattamento.

E’ inoltre assolutamente necessario che le analisi costo beneficio nella medicina di precisione vadano integrate con le analisi costo beneficio del farmaco a bersaglio molecolare, considerando il costo



globale della cura che include tutte le procedure di monitoraggio, accesso ospedaliero, mantenimento capacità lavorativa, ecc.

Un approccio emergente per la biopsia liquida è l'impiego di piattaforme di **comprehensive genome profiling (CGP)**, basate su tecnologie di *NGS*.

Il *CGP* ha in effetti rivoluzionato il trattamento dei tumori umani attraverso la possibilità che il trattamento possa venire impostato su base tessuto agnostica ovvero sulla base di un biomarcatore per un *target* "actionable" a prescindere dal tessuto di origine.

*FDA* ha infatti approvato secondo la procedura "agnostic approval":

- pembrolizumab per il trattamento di tumori solidi metastatici con elevata MSI o deficit del *mismatch repair* (MMR) (3).

- pembrolizumab per il trattamento con di tumori solidi metastatici con elevato *TMB* (4).

- larotrectinib (5) e successivamente entrectinib (6) per il trattamento di neoplasie solide con il riarrangiamento di *NTRK*.

Successivamente anche *EMA* (*European Medical Agency*) ha approvato:

- larotrectinib (7) ed entrectinib (8) per il trattamento di pazienti adulti e pediatrici affetti da tumori solidi avanzati e non resecabili con riarrangiamento di *NTRK*.

In un recente studio sono stati correlati i dati di *GCP* e le caratteristiche ed *outcomes* clinici in 4064 pazienti con *NSCLC*. È stato possibile dimostrare la concordanza fra trattamento *targeted* personalizzato e beneficio clinico in *OS* e fra elevato *TMB* e beneficio in *OS* con immunoterapia.

Tale studio anche se non disegnato formalmente per la validazione in termini di utilità clinica, offre una *vision real world* che necessiterà ulteriori analisi di *cost-effectiveness* (9).


Le piattaforme di *CGP* possono oltre all' *NGS* includere altre tecnologie in grado di analizzare acidi nucleici estratti da materiale istologico ma anche da biopsia liquida (plasma o altri fluidi biologici).

La biopsia liquida con l'utilizzo di saggi di profilazione genomica sono raccomandati dalle linee guida del *College of American Pathologists (CAP)* e dell'*International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC)*.

I vantaggi concettuali del *CGP* in biopsia liquida non si limitano alla semplicità di acquisizione del cfDNA ma anche della rappresentatività dell'intero *burden* tumorale in una dinamica longitudinale qualora si sospetti l'emergere di un nuovo *target*.

L'offerta commerciale di piattaforme di *CGP* in biopsia liquida rappresentano una grande opportunità ma pongono grosse criticità per il corretto impiego ed una adeguata accessibilità in un Sistema universalistico. Nel referto vengono in genere presentate opzioni di impiego di farmaci sulla base dei dati molecolari o viene suggerita l'adesione a studi clinici. A parte ovviamente la necessità di garantire da parte delle singole Istituzioni adeguati standard etici, un *MTB* appare necessario per definire una linea di condotta per la rimborsabilità (un possibile percorso viene offerto dal Fondo AIFA 5%: vedi Raccomandazioni *Molecular Tumor Board*) e definire un Quadro normativo che identifichi le reali condizioni di impiego di *CGP* in biopsia liquida indicandone i *needs* di maggiore priorità quali malattie orfane, condizioni di refrattarietà alla prima linea di trattamento, ecc. A questo





scopo sono necessari studi di *cost-effectiveness* nel contesto nazionale considerando ovviamente il costo del trattamento.

Una grande opportunità ma da gestire nell'ambito di un Sistema controllato e sostenibile.

#### **Bibliografia:**

1. National Institute for Health and Care Excellence. Plasma EGFR mutation tests for adults with locally advanced or metastatic non-small cell lung cancer. 2018; <https://nice.org.uk/guidance/mib137>.
2. Ontario Health (Quality). Cell-Free Circulating Tumour DNA Blood Testing to Detect EGFR T790M Mutation in People With Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: A Health Technology Assessment. *Ont Health Technol Assess Ser.* 2020;20(5):1-176.
3. FDA grants accelerated approval to pembrolizumab for first tissue/site agnostic indication. 2018; [www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs/ucm560040.htm](http://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs/ucm560040.htm).
4. FDA approves pembrolizumab for adults and children with TMB-H solid tumors. News release 2020; [bit.ly/3el8pck](https://bit.ly/3el8pck).
5. FDA approves larotrectinib for solid tumors with NTRK gene fusions. 2018; [www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs/ucm626720.htm](http://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs/ucm626720.htm).
6. FDA Approves Third Oncology Drug That Targets a Key Genetic Driver of Cancer, Rather Than a Specific Type of Tumor. FDA. 2019; <https://bit.ly/2TDORX1>.
7. EMA Press Release. First 'histology-independent' treatment for solid tumours with a specific gene mutation. 2019, CHMP/391684
8. EMA Press Release. 2020; <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/summaries-opinion/rozlytrek>.
9. Singal G, Miller PG, Agarwala V, Association of Patient Characteristics and Tumor Genomics With Clinical Outcomes Among Patients With Non-Small Cell Lung Cancer Using a Clinicogenomic Database. *JAMA.*2019;321(14):1391-1399

## ***8. Applicazioni della biopsia liquida nel contesto della ricerca clinica***


### ***8.1. Monitoraggio della risposta alla terapia***

#### **8.1.1 Monitoraggio della risposta alla terapia nel tumore del polmone**

L'utilizzo del ctDNA si sta confermando sempre più un valido ed utile strumento per il monitoraggio della risposta al trattamento in pazienti affetti da tumori solidi con alterazioni target di terapia. Le tecniche radiologiche tradizionali non producono lo stesso tipo di informazioni e questo può avere conseguenze sulla capacità di comprendere i meccanismi molecolari di resistenza limitando il potenziale diagnostico e di adattamento terapeutico. L'identificazione della MMR dopo la chirurgia, così come la capacità di predire la recidiva in tempo utile, resta ancora un importante *unmet-need*, al quale la valutazione del ctDNA può dare importanti risposte.

Il ctDNA ha una clearance relativamente elevata, e questo lo rende un ottimo biomarcatore per riflettere in tempo reale il dinamismo adattativo della malattia, fornendo un metodo potenzialmente molto utile per la gestione del paziente durante il trattamento. La rilevazione del ctDNA negli stadi avanzati del tumore del polmone è già stata dimostrata in molti studi, ed è noto che la concordanza tra ctDNA e tessuto aumenta all'aumentare della stadiazione TNM (i.e. stadio I, 57.9%; stadio II, 66.7%; stadio IIIA, 90%). Inoltre, il ctDNA si è dimostrato più sensibile rispetto ai marcatori tumorali tradizionali, tra cui CA19.9 e CEA15.5, in vari studi).

L'analisi del ctDNA è in grado di dare informazioni riguardo l'eterogeneità intratumorale, che contribuisce, tramite selezione clonale, alla comparsa della resistenza al trattamento (8). La necessità



di ottenere informazioni sull'eterogeneità tumorale del *NSCLC*, pone le basi per valutare la risposta al trattamento utilizzando il monitoraggio del ctDNA. E' stato dimostrato che alcune mutazioni bersaglio di *targeted therapy*, come *EGFR*, *MET* e *BRAF* sono per lo più mutualmente esclusive a livello clonale e compaiono precocemente nella tumorigenesi, spiegando così le risposte importanti ed uniformi che si vedono nei differenti siti di malattia quando queste alterazioni sono colpite da un trattamento *target* (9, 10). Durante la terapia, più del 75% dei tumori sviluppano una selezione clonale di alterazioni *drivers*, con la comparsa di nuove mutazioni in geni come *PIK3CA*, *NF1*, *KRAS*, *TP53*, e *NOTCH* (11). Inoltre, alcune mutazioni possono comparire in corso di terapia in singole regioni, a conferma delle limitazioni che può avere la biopsia tissutale in una singola sede (11).

Proprio in considerazione dei motivi sopra elencati, l'analisi del ctDNA riveste un ruolo molto importante nel monitoraggio della risposta al trattamento in pazienti affetti da *NSCLC* portatori di una mutazione *druggable* (i.e. *EGFR*, *ALK*). Il monitoraggio del ctDNA si è dimostrato utile non solo per identificare la comparsa di mutazioni acquisite durante il trattamento, ma anche per una valutazione quantitativa dinamica delle mutazioni note.

Molti studi hanno dimostrato che nella malattia *EGFR* mutata il ctDNA è in grado di:

- rilevare al basale sia la mutazione attivante di *EGFR* che la presenza di eventuali altre mutazioni, permettendone un monitoraggio quantitativo in grado di identificare le variazioni in maniera dinamica e quantitativa durante il trattamento con *TKIs* (gefitinib, erlotinib, afatinib, osimertinib). È stato dimostrato infatti che le variazioni del ctDNA trovano conferma nelle risposte cliniche e radiologiche, in quanto variazioni in incremento o riduzione del ctDNA correlano rispettivamente con progressioni o risposte parziali o complete al trattamento (12-14) e,
- identificare la comparsa di nuove mutazioni di resistenza contemporaneamente alla progressione di malattia o con un anticipo di circa 2 mesi (15, 16)

Anche per quanto riguarda la malattia *ALK* traslocata, il monitoraggio tramite ctDNA durante il trattamento con TKI (crizotinib, alectinib, brigatinib, ceritinib, lorlatinib) può essere un utile strumento per:

- identificare la comparsa di nuove mutazioni di resistenza a carico del gene *ALK* stesso oppure in altri geni (17, 18), e
- monitorare l'evoluzione delle mutazioni secondarie di *ALK* o altri geni, durante il trattamento (17, 18).

Tra i maggiori limiti del monitoraggio con ctDNA, resta l'impossibilità di identificare meccanismi di resistenza associati al cambiamento dell'istotipo, ed una linea guida che identifichi la tecnologia più indicata per l'esecuzione dell'analisi (19).

**In conclusione, le informazioni a sostegno dell'utilizzo della biopsia liquida a scopo di monitoraggio della *targeted therapy* nel *NSCLC* (*EGFR* mutato o *ALK* traslocato) sono solide e riproducibili. Considerando la possibilità di utilizzare linee successive di trattamento con farmaci con caratteristiche molecolari ben differenziate, per poterne sfruttare a pieno la loro potenzialità, il monitoraggio tramite ctDNA rappresenta uno strumento compatibile con una mini-invasività, e con una sensibilità e specificità idonee allo scopo.**


## Bibliografia

1. Ignatiadis M, Lee M, Jeffrey SS. Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA: Challenges and Opportunities on the Path to Clinical Utility. *Clin Cancer Res* 2015; 21: 4786-4800.
2. Diehl F, Schmidt K, Choti MA et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med* 2008; 14: 985-990.
3. Heitzer E, Ulz P, Geigl JB. Circulating tumor DNA as a liquid biopsy for cancer. *Clin Chem* 2015; 61: 112-123.
4. Diaz LA, Jr., Bardelli A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *J Clin Oncol* 2014; 32: 579-586.
5. Kang G, Chen K, Yang F et al. Monitoring of circulating tumor DNA and its aberrant methylation in the surveillance of surgical lung Cancer patients: protocol for a prospective observational study. *BMC Cancer* 2019; 19: 579.
6. Chen KZ, Lou F, Yang F et al. Circulating Tumor DNA Detection in Early-Stage Non-Small Cell Lung Cancer Patients by Targeted Sequencing. *Sci Rep* 2016; 6: 31985.
7. Chen K, Zhang J, Guan T et al. Comparison of plasma to tissue DNA mutations in surgical patients with non-small cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2017; 154: 1123-1131 e1122.
8. Greaves M. Evolutionary determinants of cancer. *Cancer Discov* 2015; 5: 806-820.
9. Mok TS, Wu YL, Thongprasert S et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* 2009; 361: 947-957.
10. Cao Y, Xiao G, Qiu X et al. Efficacy and safety of crizotinib among Chinese EML4-ALK-positive, advanced-stage non-small cell lung cancer patients. *PLoS One* 2014; 9: e114008.
11. Jamal-Hanjani M, Wilson GA, McGranahan N et al. Tracking the Evolution of Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2017; 376: 2109-2121.
12. Del Re M, Rofi E, Cappelli C et al. The increase in activating EGFR mutation in plasma is an early biomarker to monitor response to osimertinib: a case report. *BMC Cancer* 2019; 19: 410.
13. Buttitta F, Felicioni L, Lorito AD et al. Early prediction of resistance to tyrosine kinase inhibitors by plasma monitoring of EGFR mutations in NSCLC: a new algorithm for patient selection and personalized treatment. *Oncotarget* 2020; 11: 982-991.
14. Marchetti A, Palma JF, Felicioni L et al. Early Prediction of Response to Tyrosine Kinase Inhibitors by Quantification of EGFR Mutations in Plasma of NSCLC Patients. *J Thorac Oncol* 2015; 10: 1437-1443.
15. Gray JE, Okamoto I, Sriuranpong V et al. Tissue and Plasma EGFR Mutation Analysis in the FLAURA Trial: Osimertinib versus Comparator EGFR Tyrosine Kinase Inhibitor as First-Line Treatment in Patients with EGFR-Mutated Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res* 2019; 25: 6644-6652.
16. Papadimitrakopoulou VA, Han JY, Ahn MJ et al. Epidermal growth factor receptor mutation analysis in tissue and plasma from the AURA3 trial: Osimertinib versus platinum-pemetrexed for T790M mutation-positive advanced non-small cell lung cancer. *Cancer* 2020; 126: 373-380.
17. Bordi P, Tiseo M, Rofi E et al. Detection of ALK and KRAS Mutations in Circulating Tumor DNA of Patients With Advanced ALK-Positive NSCLC With Disease Progression During Crizotinib Treatment. *Clin Lung Cancer* 2017; 18: 692-697.
18. Dagogo-Jack I, Brannon AR, Ferris LA et al. Tracking the Evolution of Resistance to ALK Tyrosine Kinase Inhibitors through Longitudinal Analysis of Circulating Tumor DNA. *JCO Precis Oncol* 2018; 2018.
19. Del Re M, Crucitta S, Gianfilippo G et al. Understanding the Mechanisms of Resistance in EGFR-Positive NSCLC: From Tissue to Liquid Biopsy to Guide Treatment Strategy. *Int J Mol Sci* 2019; 20.

### 8.1.2. Monitoraggio della risposta alla terapia nel tumore del colon retto

Un campo di esplorazione della biopsia liquida nel tumore del colon retto è l'analisi molecolare dinamica dell'evoluzione della malattia, capace di rilevare l'eterogeneità biologica temporale del tumore superando anche i limiti dell'eterogeneità spaziale della biopsia su tessuto.

La ricerca di mutazioni di *RAS* nella malattia metastatica del colon retto, infatti, si prefigge l'obiettivo di monitorare la resistenza acquisita in corso di trattamento con anti-*EGFR* e l'affinamento della selezione dei pazienti da candidare ad un *rechallenge* terapeutico. In entrambi i casi ci si basa su forti evidenze traslazionali che hanno dimostrato come la resistenza in corso di anti-*EGFR* si associ all'aumento di alleli mutati *RAS* e del dominio esterno di *EGFR* e che questo comportamento segua un andamento pulsatile (1), con un decadimento esponenziale nel tempo che richiede mediamente 3.4 e 6.9 mesi, rispettivamente (2). Dati emergenti, inoltre, sono disponibili sull'utilizzo della biopsia liquida nella determinazione di meccanismi di resistenza *RAS*-indipendenti, quali per esempio



l'amplificazione di *MET* o *ERBB2* e le mutazioni di *BRAF* e *MEK*, aprendo lo scenario per nuove prospettive terapeutiche (1).

Tuttavia, **i dati a supporto dell'utilizzo della biopsia liquida a scopo di monitoraggio della terapia anti-EGFR provengono da serie limitate di pazienti e non sono conclusivi per l'utilizzo in pratica clinica (3), mancando della dimostrazione di un eventuale impatto terapeutico.**


**I dati riguardanti la selezione molecolare per il *rechallenge* sono da considerarsi fortemente suggestivi di una possibile e utile razionalizzazione dell'impiego di questa strategia terapeutica, pur necessitando di validazioni su popolazioni più ampie (4,5).**

#### **Bibliografia**

1. Siravegna G, Mussolin B, Buscarino M, et al. Clonal evolution and resistance to EGFR blockade in the blood of colorectal cancer patients. *Nat Med.* 2015 Jul;21(7):795-801. doi: 10.1038/nm.3870.
2. Parseghian CM, Loree JM, Morris VK, et al. Anti-EGFR-resistant clones decay exponentially after progression: implications for anti-EGFR re-challenge. *Ann Oncol.* 2019 Feb 1;30(2):243-249.
3. Siena S, Sartore-Bianchi A, Garcia-Carbonero R, et al. Dynamic molecular analysis and clinical correlates of tumor evolution within a phase II trial of panitumumab-based therapy in metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol.* 2018 Jan 1;29(1):119-126.
4. Cremolini C, Rossini D, Dell'Aquila E, et al. Rechallenge for Patients With RAS and BRAF Wild-Type Metastatic Colorectal Cancer With Acquired Resistance to First-line Cetuximab and Irinotecan: A Phase 2 Single-Arm Clinical Trial. *JAMA Oncol.* 2019 Mar 1;5(3):343-350.
5. Mauri G, Pizzutilo EG, Amatu A, et al. Retreatment with anti-EGFR monoclonal antibodies in metastatic colorectal cancer: Systematic review of different strategies. *Cancer Treat Rev.* 2019 Feb;73:41-53.

## **8.2. Analisi di liquidi biologici diversi dal plasma**

Ai giorni nostri, per “biopsia liquida”, da un punto di vista strettamente legato all'approvazione clinica, viene considerato esclusivamente il prelievo di sangue venoso periferico. In questo ambito l'unico analita clinicamente rilevante per l'esecuzione di analisi molecolari è rappresentato dal ctDNA estratto da plasma (1). In realtà, il concetto di “biopsia liquida” è molto più ampio e va ad abbracciare, oltre al sangue venoso periferico, anche altri fluidi biologici (urina, saliva, liquido cefalorachidiano, liquido pleurico, altri versamenti) (2). In questo ambito è stato dimostrato come l'analisi condotta su acidi nucleici estratti da questi fluidi possa garantire risultati analoghi a quelli ottenuti su campione ematico. Addirittura l'analisi condotta su questi fluidi biologici potrebbe garantire risultati superiori al plasma quando si va a considerare la valutazione di lesioni metastatiche in particolari siti anatomici (ad esempio il sistema nervoso centrale) (3). Numerosi studi hanno evidenziato la presenza di materiale genetico tumorale in questi fluidi rendendo questi campioni candidati a pieno titolo nella valutazione dell'assetto mutazionale ai fini predittivi e prognostici, nel monitoraggio della risposta ai trattamenti, nella valutazione di malattia minima residua e nella valutazione tempestiva della comparsa di meccanismi di resistenza ad un determinato trattamento, nei pazienti affetti da neoplasia maligna (2). A livello renale, la filtrazione glomerulare rappresenta un processo naturale di ultrafiltrazione del plasma, permettendo il passaggio nelle urine di piccoli frammenti di DNA, anche quello liberato dal tumore (4). Il più grande vantaggio delle urine, rispetto ad altri campioni, è rappresentato dalla non invasività del prelievo e dalla possibilità di disporre di un campione pressoché illimitato ottenuto con un'ottima *compliance* del paziente (2). Purtroppo un limite non trascurabile è rappresentato dalla elevata attività della DNA idrolasi urinaria che contribuisce ad una rapida




degradazione del DNA (5). Nonostante questo limite, utilizzando metodiche dotate di un'elevatissima sensibilità è possibile ottenere ottimi risultati sul campione di urine in termini di sensibilità e specificità nella rilevazione di mutazioni clinicamente rilevanti (6). Nello studio clinico di fase 1/2 per rociletinib (TIGER-X), gli autori hanno confrontato i risultati ottenuti nella rilevazione di tre diverse mutazioni in *EGFR* (p.T790M dell'esone 20, p.L858R dell'esone 21 e delezioni dell'esone 19) sul campione di urine (90-100 ml) con quelli ottenuto su corrispondente campione tissutale (*gold standard*). I risultati sul campione di urine hanno evidenziato una sensibilità pari al 93%, 80% e 83% ed una specificità per le stesse mutazioni pari al 96%, 100% e 94% (7). Sebbene la puntura lombare sia una procedura piuttosto invasiva, l'analisi del DNA tumorale estratto dal liquido cefalo-rachidiano trova, come già accennato, indicazione soprattutto in casi di malattia metastatica con singola localizzazione al sistema nervoso centrale (2). Diversi studi hanno infatti evidenziato come l'analisi del DNA tumorale estratto da liquido-cefalorachidiano sia in grado di garantire risultati superiori, in termini di identificazione delle mutazioni, rispetto al plasma, permettendo ad un numero maggiore di pazienti affetti da neoplasia maligna metastatica di accedere a trattamenti farmacologici mirati (8, 9). In maniera simile, anche liquido pleurico e liquido ascitico hanno evidenziato promettenti risultati soprattutto in casi di patologia neoplastica localizzata al torace ed all'addome, rispettivamente (9). L'indicazione al possibile utilizzo della saliva deriva dall'evidenza della presenza al suo interno di differenti proteine, acidi nucleici, elettroliti, ed ormoni liberati da organi differenti (2). Oggetto di studio nei pazienti con carcinoma del polmone a cellule non piccole, il suo possibile utilizzo nella pratica clinica è fortemente limitato dalla bassa sensibilità (non superiore al 50%) (10). Oltre ai fluidi biologici, recentemente sono entrati a far parte in un contesto più ampio del concetto di "biopsia liquida" anche i fluidi di scarto che si producono durante la processazione dei campioni citologici (11). In questo caso, infatti, l'analisi molecolare condotta su acidi nucleici estratti da questi fluidi di scarto potrebbe andare ad integrare la diagnosi morfologica evitando di sacrificare il materiale diagnostico tissutale (11).

### **Bibliografia**

1. Pisapia P, Malapelle U, Troncone G. Liquid Biopsy and Lung Cancer. *Acta Cytol.* 2019;63:489-496.
2. Siravegna G, Marsoni S, Siena S, Bardelli A. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2017;14:531-548.
3. Rolfo C, Mack PC, Scagliotti GV, et al. Liquid Biopsy for Advanced Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC): A Statement Paper from the IASLC. *J Thorac Oncol.* 2018;13:1248-1268.
4. Su YH, Wang M, Brenner DE, et al. Human urine contains small, 150 to 250 nucleotide-sized, soluble DNA derived from the circulation and may be useful in the detection of colorectal cancer. *J Mol Diagn.* 2004;6:101-7.
5. Nadano D, Yasuda T, Kishi K. Measurement of deoxyribonuclease I activity in human tissues and body fluids by a single radial enzyme-diffusion method. *Clin Chem.* 1993;39:448-52.
6. Fujii T, Barzi A, Sartore-Bianchi A, et al. Mutation-Enrichment Next-Generation Sequencing for Quantitative Detection of KRAS Mutations in Urine Cell-Free DNA from Patients with Advanced Cancers. *Clin Cancer Res.* 2017;23(14):3657-3666. doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-2592
7. Reckamp KL, Melnikova VO, Karlovich C, et al. A Highly Sensitive and Quantitative Test Platform for Detection of NSCLC EGFR Mutations in Urine and Plasma. *J Thorac Oncol.* 2016;11:1690-700.
8. Ying S, Ke H, Ding Y, et al. Unique genomic profiles obtained from cerebrospinal fluid cell-free DNA of non-small cell lung cancer patients with leptomeningeal metastases. *Cancer Biol Ther.* 2019;20:562-570.



- 
9. Villatoro S, Mayo-de-Las-Casas C, Jordana-Ariza N, et al. Prospective detection of mutations in cerebrospinal fluid, pleural effusion, and ascites of advanced cancer patients to guide treatment decisions. *Mol Oncol.* 2019;13:2633-2645.
  10. Hubers AJ, Heideman DA, Yatabe Y, et al. EGFR mutation analysis in sputum of lung cancer patients: a multi technique study. *Lung Cancer.* 2013;82:38-43.
  11. Roy-Chowdhuri S, Mehrotra M, Bolivar AM, et al. Salvaging the supernatant: next generation cytopathology for solid tumor mutation profiling. *Mod Pathol.* 2018;31:1036-1045.

### **8.3. Potenziali applicazioni nell' immunoterapia**

Gli Inibitori di check-point immunitari (*immune-checkpoint* inhibitors, *ICIs*), somministrati da soli o in combinazione, hanno rappresentato un'importante rivoluzione nel trattamento di numerose neoplasie aumentandone le percentuali di sopravvivenza. Tuttavia, non tutti i pazienti traggono beneficio dal trattamento e soltanto una parte di essi mostra una risposta significativa o un beneficio a lungo termine. Fattori biologici e/o immunitari individuali influiscono probabilmente sulla eterogeneità nella risposta. Per tale motivo l'identificazione di biomarcatori predittivi di risposta o di resistenza al trattamento con ICI assume oggi un ruolo particolarmente importante al fine di selezionare i pazienti che possono trarre maggior beneficio dall'immunoterapia.


Molti elementi biologici e tecnici comportano che la determinazione dell'espressione immunoistochimica di *PD-L1* su tessuto tumorale non sia adeguatamente rappresentativa della neoplasia nel suo complesso, e della eterogeneità anche temporale che spesso la caratterizza (1). Anche il *TMB*, proposto più recentemente come marcatore predittivo, necessita di una maggiore standardizzazione e di una ulteriore validazione analitica e clinica. In tale contesto, l'utilizzo della biopsia liquida potrebbe superare, nel prossimo futuro, alcuni di questi limiti.

Facendo seguito alle importanti informazioni ottenute dall'utilizzo della profilazione genomica in pazienti in trattamento con *targeted therapy*, attualmente numerosi studi sono in corso con l'obiettivo di valutare il potenziale utilizzo di cfDNA/ctDNA e CTC, ma anche delle forme solubili di *checkpoints* immunitari, di talune sottopopolazioni linfocitarie come le cellule T, e di vescicole esosomiali, quali biomarcatori predittivi di risposta nei pazienti in trattamento con *ICIs*.

Alcuni studi hanno valutato in diverse neoplasie l'espressione dei livelli plasmatici o sierici basali di *PD-L1*, dosati singolarmente o in associazione ad altri *checkpoints* immunitari (2-6). Tali studi hanno mostrato che elevati livelli della forma solubile di *PD-L1* (*sPD-L1*) sono associati a caratteristiche prognostiche sfavorevoli e ad un peggiore *outcome* clinico. I risultati dei primi studi condotti su pazienti sottoposti a trattamento con *ICIs* sembrano, inoltre, evidenziarne un ruolo predittivo, che va tuttavia confermato in più ampie coorti prospettiche (7-9).

Inoltre, anche il *PD-L1* esosomiale può essere rilevato nel plasma ed è stato studiato come biomcatore, mostrando come concentrazioni elevate di *PD-L1* esosomiale in pazienti affetti da melanoma in trattamento con ICI siano associate a prognosi peggiore (10,11).

La valutazione dell'espressione di *PD-L1* su CTC, invece, rimane ad oggi tecnicamente più complessa, prevalentemente a causa dei bassi livelli CTC riscontrabili nei fluidi biologici, e i risultati degli studi pubblicati appaiono piuttosto eterogenei (12,13).



Recentemente alcuni studi hanno mostrato come la valutazione quantitativa del cfDNA e del “numero di instabilità genomica” (“*Genomic Instability number*” - *GIN*), ma anche la determinazione del *TMB* su plasma (*blood TMB* [bTMB]) possano essere predittivi di risposta ad *ICIs*. In uno studio che ha analizzato la concentrazione di cfDNA e *GIN* in diversi tumori solidi, in cui un *GIN* più elevato indicava più alterazioni del numero di copie, una riduzione del *GIN* durante il trattamento era predittiva di risposta (14). Su cfDNA è anche possibile studiare la presenza di differenti mutazioni genetiche e di instabilità dei microsatelliti (15). Per esempio le mutazioni del gene *STK11* sembrano associate ad una riduzione della risposta terapeutica in pazienti con *NSCLC* in trattamento con *ICIs* (16).


Molteplici sono anche le evidenze a favore di un potenziale ruolo predittivo del *bTMB*, studiato soprattutto in pazienti con *NSCLC* in trattamento immunoterapico (17); tali evidenze necessitano, tuttavia, di una validazione tecnica che tenga conto della possibilità di alterazioni genomiche legate al fenomeno dell’ematopoiesi clonale (18).

Infine, sembrano promettenti anche i dati sperimentali riguardanti lo studio del *T-cell receptor* (*TCR*) dei linfociti T-periferici, effettuata mediante il sequenziamento della regione complementare-determinante 3 (*CDR3*), unica per ciascun *TCR*. Questo studio funzionale dei linfociti T, permette di definire la concentrazione del “repertorio di cellule T” con la stessa specificità neoantigenica ed è attualmente in studio per stratificazione dei pazienti in trattamento immunoterapico (19,20).

L’applicazione della biopsia liquida all’immunoterapia rappresenta, pertanto, un ambito di attiva ricerca, che ha la potenzialità di fornire nel prossimo futuro dei biomarcatori “dinamici” e ripetibili, nell’ottica della personalizzazione del trattamento immunoterapico.

## **Bibliografia**

1. Incorvaia L, Fanale D, ... Russo A, et al. Programmed Death Ligand 1 (PD-L1) as a Predictive Biomarker for Pembrolizumab Therapy in Patients with Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer (NSCLC). *Adv Ther*. 2019;36(10):2600-2617. doi:10.1007/s12325-019-01057-7
2. Finkelmeier F, Canli Ö, Tal A, et al. High levels of the soluble programmed death-ligand (sPD-L1) identify hepatocellular carcinoma patients with a poor prognosis. *Eur J Cancer*. 2016;59:152-159. doi:10.1016/j.ejca.2016.03.002
3. Bian B, Fanale D, ... Russo A, et al. Prognostic significance of circulating PD-1, PD-L1, pan-BTN3As, BTN3A1 and BTLA in patients with pancreatic adenocarcinoma. *Oncoimmunology*. 2019;8(4):e1561120. Published 2019 Feb 3. doi:10.1080/2162402X.2018.1561120
4. Takahashi N, Iwasa S, Sasaki Y, et al. Serum levels of soluble programmed cell death ligand 1 as a prognostic factor on the first-line treatment of metastatic or recurrent gastric cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2016;142(8):1727-1738. doi:10.1007/s00432-016-2184-6
5. Zhou J, Mahoney KM, Giobbie-Hurder A, et al., Soluble PD-L1 as a biomarker in malignant melanoma treated with checkpoint blockade, *Cancer Immunol Res*. 2017 June ; 5(6): 480–492. doi:10.1158/2326-6066.CIR-16-0329.
6. Incorvaia L, Badalamenti G, ... Russo A, et al. Can the plasma PD-1 levels predict the presence and efficiency of tumor-infiltrating lymphocytes in patients with metastatic melanoma?. *Ther Adv Med Oncol*. 2019;11:1758835919848872. Published 2019 May 13. doi:10.1177/1758835919848872
7. Costantini A, Julie C, Dumenil C, et al. Predictive role of plasmatic biomarkers in advanced non-small cell lung cancer treated by nivolumab. *Oncoimmunology*. 2018;7(8):e1452581. Published 2018 Apr 20. doi:10.1080/2162402X.2018.1452581
8. Okuma Y, Wakui H, Utsumi H, et al. Soluble Programmed Cell Death Ligand 1 as a Novel Biomarker for Nivolumab Therapy for Non-Small-cell Lung Cancer. *Clin Lung Cancer*. 2018;19(5):410-417.e1. doi:10.1016/j.clcc.2018.04.014
9. Tiako Meyo M, Jouinot A, Giroux-Leprieur E, et al. Predictive Value of Soluble PD-1, PD-L1, VEGFA, CD40 Ligand and CD44 for Nivolumab Therapy in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: A Case-Control Study. *Cancers (Basel)*. 2020;12(2):473. Published 2020 Feb 18. doi:10.3390/cancers12020473
10. Chen G, Huang AC, Zhang W, et al. Exosomal PD-L1 contributes to immunosuppression and is associated with anti-PD-1 response. *Nature*. 2018;560(7718):382-386. doi:10.1038/s41586-018-0392-8

- 
11. Cordonnier M, Nardin C, Chanteloup G, et al. Tracking the evolution of circulating exosomal-PD-L1 to monitor melanoma patients. *J Extracell Vesicles*. 2020;9(1):1710899. Published 2020 Jan 7. doi:10.1080/20013078.2019.1710899
  12. Guibert N, Delaunay M, Lusque A et al. PD-L1 expression in circulating tumor cells of advanced non-small cell lung cancer patients treated with nivolumab. *Lung Cancer* 2018; 120: 108–112.
  13. Yue C, Jiang Y, Li P et al. Dynamic change of PD-L1 expression on circulating tumor cells in advanced solid tumor patients undergoing PD-1 blockade therapy. *Oncoimmunology* 2018; 7(7): e1438111.
  14. Jensen TJ, Goodman AM, Kato S et al. Genome-wide sequencing of cell-free DNA identifies copy-number alterations that can be used for monitoring response to immunotherapy in cancer patients. *Mol Cancer Ther* 2019; 18(2): 448–458.
  15. Rizvi H, Sanchez-Vega F, La K et al. Molecular determinants of response to anti-programmed cell death (PD)-1 and anti-programmed death-lig- and 1 (PD-L1) blockade in patients with non-small-cell lung cancer profiled with targeted next-generation sequencing. *J Clin Oncol* 2018; 36(7): 633–641.
  16. Rizvi H, Sanchez-Vega F, La K et al. Molecular determinants of response to anti-programmed cell death (PD)-1 and anti-programmed death-lig- and 1 (PD-L1) blockade in patients with non-small-cell lung cancer profiled with targeted next-generation sequencing. *J Clin Oncol* 2018; 36(7): 633–641.
  17. Gandara DR, Paul SM, Kowanetz M et al. Blood-based tumor mutational burden as a predictor of clinical benefit in non-small-cell lung cancer patients treated with atezolizumab. *Nat Med* 2018; 24(9): 1441–1448.
  18. Ptashkin RN, Mandelker DL, Coombs CC et al. Prevalence of clonal hematopoiesis mutations in tumor-only clinical genomic profiling of solid tumors. *JAMA Oncol* 2018; 4(11): 1589.
  19. Machado JC, Reis J, Fernandes M et al. Tumor-specific neoantigens drive T-cell clonotype convergence. *Eur J Cancer* 2018; 92: S11.
  20. Hofman P, Heeke S, Alix-Panabières C, Pantel K. Liquid biopsy in the era of immuno-oncology: is it ready for prime-time use for cancer patients?. *Ann Oncol*. 2019;30(9):1448-1459. doi:10.1093/annonc/mdz196


## 9. La refertazione

La refertazione è parte integrante della procedura diagnostica e dovrebbe contenere le seguenti informazioni:

- L’identificazione univoca del paziente comprendente codice fiscale
- L’identificazione del medico e della struttura che ha richiesto l’analisi.
- La motivazione della richiesta (*setting* clinico e obiettivo dell’esame richiesto)
- Il materiale utilizzato per l’analisi (tipologia, volume)
- Il momento del prelievo (diagnosi, periodo intra-post chemioterapia o terapia biologica)
- La data del prelievo del materiale utilizzato per l’analisi
- Le modalità di conservazione del prelievo
- La data di arrivo del campione nel laboratorio che esegue l’analisi
- La metodica impiegata per l’esecuzione dell’analisi con indicazione della sensibilità e dei limiti del test
- Le mutazioni indagate
- I risultati del test, con specificazione del tipo di mutazione eventualmente rilevata
- L’interpretazione del dato e una valutazione complessiva dell’analisi con le eventuali problematiche legate al caso
- Tutte le mutazioni rilevabili con la metodica utilizzata vanno dettagliate e insieme al riscontro di eventuali mutazioni nel campione analizzato vanno definite le loro caratteristiche di sensibilità e/o resistenza.

Il referto deve essere compilato su un modello prestabilito (*checklist* collegata al gestionale LIS del laboratorio), datato e firmato (possibilmente in modo digitale) dal dirigente esecutore e dal responsabile del servizio.





In considerazione dell'impatto sulla strategia terapeutica, il tempo per la refertazione non deve superare i 5 giorni lavorativi dalla richiesta della determinazione.

Nota: data la sensibilità diagnostica globale dei risultati ottenuti su plasma e siero (circa 87%), per sensibilità analitiche dell'1%, i risultati negativi per mutazione NON vanno identificati come “*wild type*”, essendo sempre possibile una falsa negatività.

Per effetto di una dinamica variabile di rilascio in circolo del cfDNA, l'esito della metodica su biopsia liquida non raggiunge il 100% di concordanza rispetto alla biopsia tissutale. In caso di negatività si consiglia pertanto di ripetere la ricerca di mutazioni in prima istanza su una seconda biopsia liquida e/o su biopsia tissutale, se tecnicamente effettuabile.