

CLINICAL

Interview

n.1 / 2024

**HOW DECODING BIOMARKERS PROFILE
IN NSCLC 2.0: sharing the experience between
oncologists and molecular pathologists**



Contenuti

03

RAZIONALE SCIENTIFICO

04

PROF. GIANCARLO TRONCONE

LA NECESSITÀ DI UN APPROCCIO MORFO - MOLECOLARE

10

PROF. ROBERTO BIANCO

APPROCCIO AI PAZIENTI CON TUMORE DEL POLMONE IN STADIO AVANZATO: FOTOGRAFIA DEL CONTESTO ATTUALE

12

DOTT. LUCA SALA

I NUOVI ORIZZONTI PER LA GESTIONE DEI PAZIENTI CON TUMORE DEL POLMONE IN STADIO AVANZATO

15

PROF. UMBERTO MALAPELLE

CARATTERIZZAZIONE DEI MARCATORI PREDITTIVI DI RISPOSTA MEDIANTE NGS

19

CASI FORMATIVI "TMB - LIKE"

21

ESERCITAZIONE PRATICA "NGS JOURNEY"

25

TAKE HOME MESSAGE

30

REFERENZE

CLINICAL INTERVIEW®
N. 1 / 2024

Numero registrazione Tribunale Ordinario di Milano: 8267/2023

Registro degli Operatori di Comunicazione: numero 39798
Codice fiscale: 12389510152

ISSN 2704-6397

EDITORE

Medica

EDITORIA E DIFFUSIONE SCIENTIFICA

Medica - Editoria e Diffusione Scientifica Srl con Unico Socio

Corso Buenos Aires, 43
20124 Milano

T +39 02 76281337

F +39 02 93661995

M info@medicacom.it

W www.medicacom.it

Direttore responsabile

Carlo Massimo Cristoforetti

Creatività e impaginazione

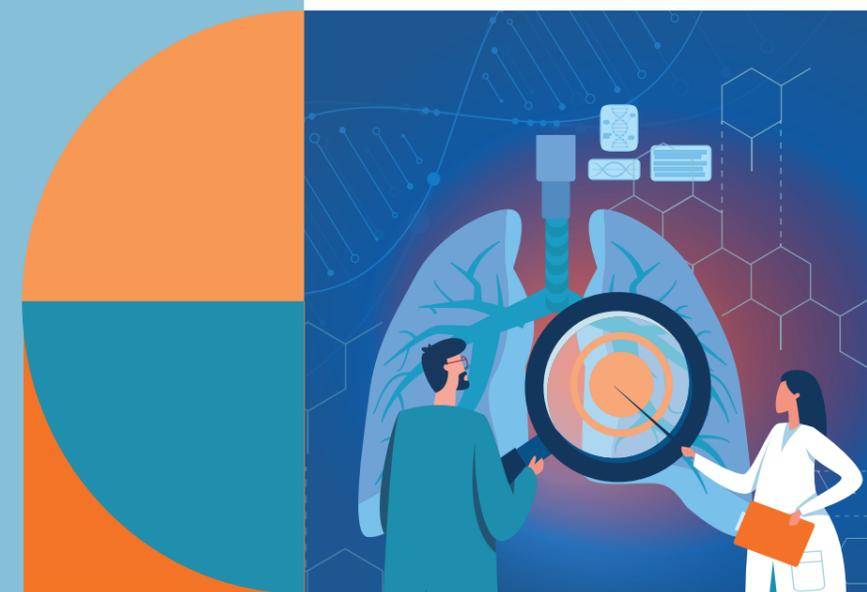
1258 Brand Care Srl

Stampa

Loretaprint Srl

RAZIONALE SCIENTIFICO

Nell'era della medicina personalizzata l'aumento costante del numero dei biomarcatori di risposta al trattamento ha notevolmente modificato le strategie di gestione clinica dei pazienti affetti da carcinoma al polmone a cellule non piccole (NSCLC). In questo scenario, il recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR), secondo le direttive emesse dalle società internazionali IASLC/AMP/CAP, ha rappresentato la porta di ingresso delle caratterizzazioni molecolari nei pazienti affetti da NSCLC. Sulla scia del beneficio clinico osservato nei pazienti portatori di alterazioni molecolari a carico EGFR, gli studi clinici hanno ampliato il ventaglio di biomarcatori approvati in pratica clinica attraverso l'integrazione di alterazioni molecolari che spaziassero dalla ricerca di mutazioni puntiformi in sequenze geniche come BRAF, KRAS alla valutazione di riarrangiamenti genici di rilevanza clinica in geni come ALK, ROS1, RET, NTRK. Un ulteriore elemento di complessità nell'ambito delle caratterizzazioni molecolari finalizzate alla rilevazione delle alterazioni che predicono sensibilità al trattamento con farmaci a bersaglio molecolare è rappresentato dall'implementazione nel pannello dei "must test genes" delle mutazioni causative dello skipping aberrante dell'esone 14 del gene MET. In questo scenario l'armonizzazione delle procedure preanalitiche di gestione del materiale biologico indirizzato alla profilazione genomica, l'implementazione di tecnologie di caratterizzazione molecolare in grado di rispondere al quesito clinico sollevato dall'oncologo, la generazione di un report inclusivo delle informazioni tecnico di semplice consulto da parte dell'oncologo clinico che segue il paziente oncologico sono ancora oggi oggetto di dibattito e di discussione per ottimizzare il percorso clinico diagnostico del paziente affetto da NSCLC.





AUTORE:

PROF. GIANCARLO TRONCONE

Capo Dipartimento di Sanità Pubblica, Università degli Studi di Napoli Federico II

LA NECESSITÀ DI UN APPROCCIO MORFO – MOLECOLARE

Negli ultimi anni abbiamo assistito ad una rivoluzione in termini di farmaci a bersaglio molecolare approvati nella pratica clinica dei pazienti affetti da NSCLC. Il rapido e progressivo aumento delle strategie terapeutiche disponibili per i pazienti oncologici deriva dall'ampliamento del numero di biomarcatori approvati in pratica clinica dalle società internazionali CAP/IASCL per i quali gli studi clinici hanno evidenziato un beneficio clinico derivante dalla somministrazione dei farmaci a bersaglio molecolare. In questo scenario è opportuno distinguere un pannello di minima che include i biomarcatori già approvati in pratica clinica (hotspot mutazionali in *EGFR*, *KRAS p.G12C*, *BRAF*; traslocazioni aberranti in *ALK*, *ROS1*, *RET*, *NTRK*; le mutazioni causative dello skipping dell'esone 14 di *MET*, l'espressione recettoriale di PD-L1) rispetto ai biomarcatori in dirittura di approvazione come da indicazione dagli studi clinici (*ERBB2*). In questo scenario, le tecnologie singletest (*RT-PCR*, *IHC*) fino ad ora largamente impiegate nei laboratori di anatomia patologica per la profilazione genomica, oggi risultano inadeguate a causa del limitato reference range e della scarsa applicabilità a rilevare alterazioni a carico dei marcatori emergenti. Il problema principale che affligge la caratterizzazione molecolare dei riarrangiamenti aberranti risiede nell'inadeguatezza tecnica da parte delle tecnologie convenzionali (*FISH*) di rilevare tutti i partner di fusioni che, unitamente all'estrema variabilità nel 'interpretazione del segnale fluorescente da parte dell'operatore, evidenzia limiti sostanziali alla diffusibilità in pratica clinica. A causa di queste criticità, lo switch verso tecnologie analogico-digitali (*NGS*) che consentano l'analisi qualitativa e quantitativa delle alterazioni molecolari nei pazienti affetti da NSCLC eleggibili alla terapia target ha rappresentato la logica conseguenza dello scenario diagnostico attuale. Altro vantaggio di queste tecnologie deriva dall'estrema versatilità delle piattaforme di *NGS* di produrre risultati molecolari validi indipendentemente dalla tipologia di campione di partenza. Sulla base di questi vantaggi, i sistemi di *NGS* hanno invaso la pratica clinica portando allo sviluppo

di piattaforme e saggi caratterizzati da parametri tecnici differenti. L'eterogeneità tecnica che caratterizza le piattaforme di *NGS* richiede studi di armonizzazione finalizzati all'ottimizzazione dei percorsi diagnostici incentrati sulla analisi genomica di campioni reali. Questo esercizio è preordinante ai fini della preparazione dei laboratori di patologia molecolare predittiva alla valutazione di biomarcatori di nuova generazione (*NRG1*, *BRCA1/2*, *MAP2K1*) oggetto di valutazione in studi clinici di fase III per i pazienti affetti da NSCLC. Alla luce di questo continuo rinnovamento che porta all'aumento esponenziale delle informazioni molecolari da consegnare agli oncologi, la discussione dei risultati delle piattaforme *NGS* in pratica clinica richiede lo sviluppo di una rete gerarchica di gruppi multidisciplinari che gestiscano la complessità molecolare e la traducano in un'informazione clinicamente spendibile per il paziente oncologico.

Testing approaches

- ✗ Single-gene testing
- ✗ Small-panel NGS

Current biomarkers

ALK	BRAF V600
EGFR	MET
ROS1	KRAS G12C
ERBB2 mutations	RET
NTRK	PD-L1

Emerging biomarkers

STK11	TP53
KEAP1	TMB
MAP2K1	PIK3CA
BRAF non-V600	NRG1
BRCA1/2	ERBB2 amplifications

✓ Large-panel NGS

Regional implementation of large-panel NGS + MTB

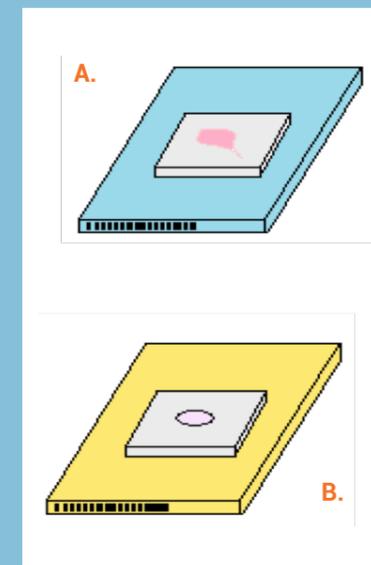


Fig. A. Tissue biospy

Fig. B. Cell - block

APPROCCIO AI PAZIENTI CON TUMORE DEL POLMONE IN STADIO AVANZATO: FOTOGRAFIA DEL CONTESTO ATTUALE

AUTORE:

PROF. ROBERTO BIANCO

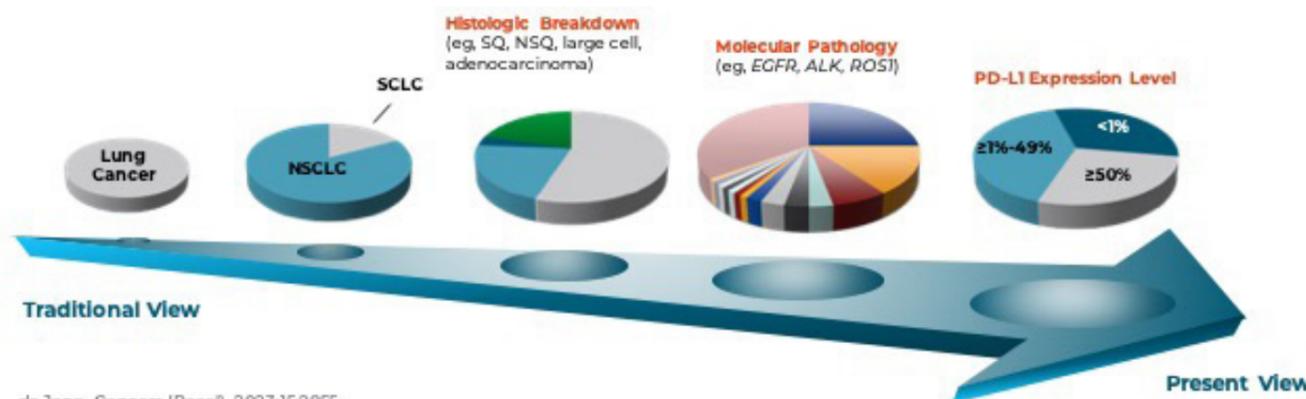
Professore Ordinario di Oncologia Medica, Dipartimento di Medicina Clinica e Chirurgia, Università degli Studi di Napoli "Federico II"

Lo scenario clinico attuale del paziente affetto da NSCLC con malattia avanzata ha beneficiato enormemente della rivoluzione molecolare portando alla definizione di nuove classi diagnostiche non solo basate sulla caratterizzazione morfologica ma arricchite dai dati di profilazione molecolare. L'applicazione delle piattaforme di NGS ha incrementato il numero di alterazioni actionable nei pazienti affetti da NSCLC evidenziando come circa il 70% dei pazienti con NSCLC sono caratterizzati da driver molecolari noti. Sulla scia di questi risultati, lo stesso approccio ha iniziato a rivelare le basi molecolari del tumore SCLC evidenziando che anche questo isotipo può trarre vantaggio dalle analisi di profilazione molecolare. I trattamenti oggi disponibili nel setting avanzato dei pazienti affetti da NSCLC stratificano tra prima e seconda linea la popolazione dei pazienti che possa beneficiare di un trattamento target sulla base delle informazioni molecolari ottenute dall'analisi genomica. Entrando nel dettaglio dei marcatori noti, *EGFR* ha rappresentato il capostipite della terapia personalizzata nei pazienti con NSCLC attraverso l'approvazione in pratica clinica di TKIs finalizzati all'inibizione selettiva delle cellule portatrici delle alterazioni molecolari. Il progresso tec-

nico scientifico ha sancito lo sviluppo e l'impiego in clinica di nuove classi di TKIs con profili di efficacia selettivi in relazione alla tipologia di alterazione molecolare identificata nel recettore. In questo scenario, Osimertinib (TKI di 3 generazione) dapprima sviluppato per targettare esclusivamente la mutazione di resistenza p.790M a carico dell'esone 20 di *EGFR* dopo resistenza al trattamento di prima linea con TKIs di prima generazione, ha mostrato tassi di risposta in prima linea per pazienti portatori di alterazioni molecolari in *EGFR* non selezionate. L'idea della necessità di dover acquisire il dato di tipizzazione delle alterazioni molecolari trova pieno riscontro nell'utilizzo degli inibitori di *ALK* che hanno evidenziato tassi di risposta estremamente dipendenti dalla tipologia di riarrangiamento individuato. Nonostante la bassa rappresentatività nella popolazione di pazienti affetti da NSCLC oncogene addicted (2.0%), le traslocazioni di *ROS1* evidenziano una sopravvivenza globale di 51.4 mesi con una risposta obiettiva in tutti i casi caratterizzati da questa etichetta molecolare. Il panorama degli inibitori selettivi di *BRAF* è caratterizzato dalla combinazione di anti *ERK* ed anti *BRAF* mostrando come questo approccio incrementi significativamente la risposta oggettiva, la progressione libera da neoplasia e la sopravvivenza media nei pazienti portatori di alterazioni a carico del codone 600 del gene *BRAF*. Nonostante la scarsa frequenza nella popolazione di pazienti affetti da NSCLC oncogene addicted, i riarrangiamenti genici a carico di *NTRK* rendono i pazienti candidabili al trattamento con inibitori selettivi la proteina chimerica. Infine, le traslocazioni che interessano il gene *RET* sono per lo più associate a manifestazioni immuno-fenotipiche specifiche evidenziando un rate di risposta significativa in termini di progressione libera da neoplasia e tasso di risposta oggettiva nei pazienti

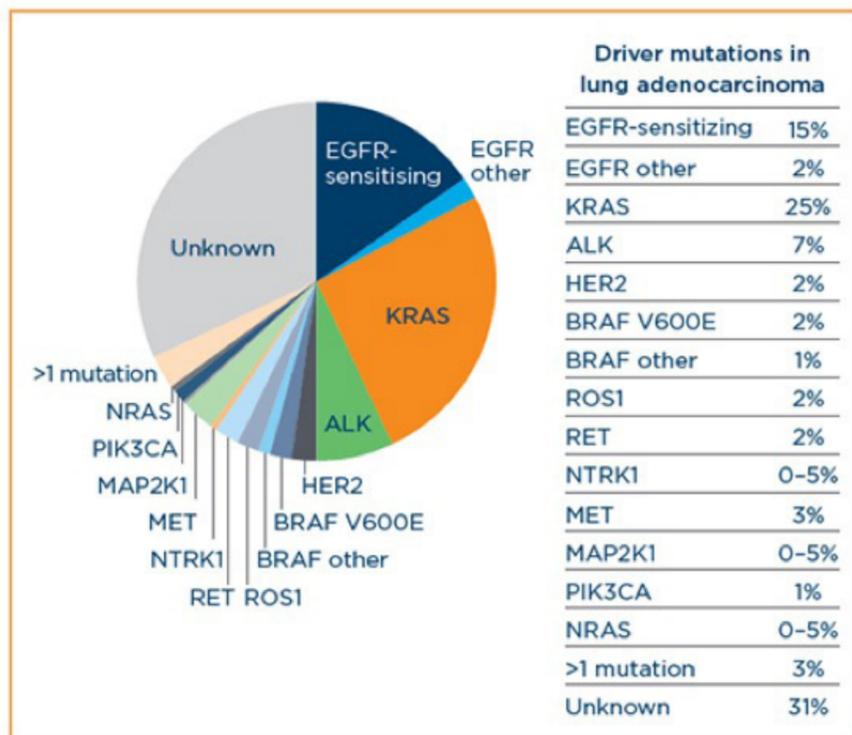
portatori dell'alterazione molecolare. Nell'ambito della patologia oncogene addicted, *MET* rappresenta un marcatore multiparametrico perché ad oggi le mutazioni causative dell'esone 14 del gene eleggono i pazienti al trattamento con inibitori specifici ma sono oggetto di valutazione trattamenti finalizzati a bersagliare la variazione del numero di copie e le traslocazioni del gene. In approvazione AIFA riscontriamo l'alterazione molecolare p.G12C dell'esone 2 del gene *KRAS* che vede rovesciato il paradigma clinico nel setting dei pazienti con NSCLC in stadio avanzato. Lo sviluppo di inibitori che covalentemente sono in grado di legare il recettore che ospita questa modifica strutturale evidenzia un beneficio clinico significativo nella seconda linea dei pazienti con NSCLC. Se questo rappresenta lo scenario clinico per i pazienti affetti da NSCLC caratterizzati da alterazioni predittive differenti, i trattamenti per i pazienti con malattia avanzata in assenza di driver molecolari è incentrata sull'impiego di ICI in prima linea in combinazione con chemioterapia indipendentemente dallo stato di espressione di *PD-L1*. Gli studi hanno evidenziato performance cliniche estremamente eterogenee in relazione all'utilizzo dei diversi ICI approvati in pratica clinica.

Evolution of Therapy in Lung Cancer

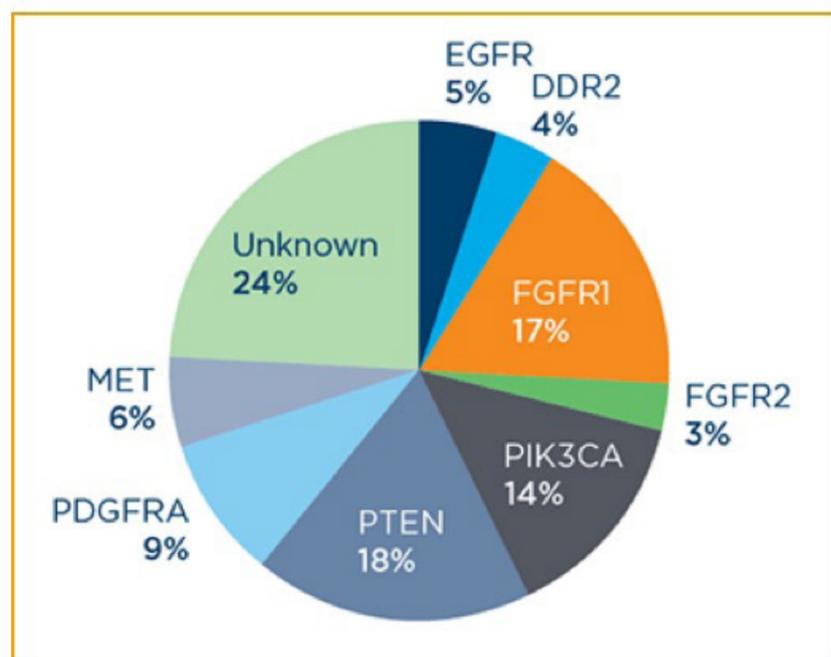


NSCLC: UNA MALATTIA ONCOGENE ADDICTED

DRIVER MUTATIONS IN LUNG ADENOCARCINOMA



DRIVER MUTATIONS IN SQUAMOUS CELL LUNG CANCER



INDICATIONS FOR ICIS IN ADVANCED NSCLC (PD-L1 ≥50%)

ICI Regimen	Indication (FDA Approval)
Atezolizumab	1L metastatic NSCLC, no <i>EGFR</i> or <i>ALK</i> aberrations (PD-L1 ≥50% or IC ≥10%)
Cemiplimab	1L for locally advanced or metastatic NSCLC, no <i>EGFR</i> , <i>ALK</i> , or <i>ROS1</i> aberrations (PD-L1 ≥50%)
Pembrolizumab*	1L for metastatic [†] NSCLC (PD-L1 ≥1%), no <i>EGFR</i> or <i>ALK</i> aberrations or 2L for metastatic NSCLC (PD-L1 ≥1%), no <i>EGFR</i> or <i>ALK</i> aberrations after platinum CT

*Single-agent pembrolizumab approved for ≥1% PD-L1 but not broadly recommended by experts; guideline recommended for PD-L1 1%-49% if poor PS or contraindications to combining with CT.
[†]Also indicated as 1L treatment for patients with stage III NSCLC who are not candidates for surgical resection or definitive chemoradiation.

Atezolizumab PI. Cemiplimab PI. Pembrolizumab PI.

INDICATIONS FOR ICIS IN ADVANCED NSCLC (PD-L1 <50%)

ICI Regimen	Indication (FDA Approval)
Nonsquamous	
Atezolizumab + bevacizumab + carboplatin + paclitaxel	1L for metastatic nonsquamous NSCLC, no <i>EGFR</i> or <i>ALK</i> aberrations
Atezolizumab + carboplatin + nab-paclitaxel	1L for metastatic nonsquamous NSCLC, no <i>EGFR</i> or <i>ALK</i> aberrations
Pembrolizumab + pemetrexed + platinum CT	1L for metastatic nonsquamous NSCLC, no <i>EGFR</i> or <i>ALK</i> aberrations
Squamous	
Pembrolizumab + carboplatin + (nab-)paclitaxel	1L for metastatic squamous NSCLC
Any histology	
Cemiplimab + platinum-based CT	1L for locally advanced or metastatic NSCLC, no <i>EGFR</i> , <i>ALK</i> , or <i>ROS1</i> aberrations
Durvalumab + tremelimumab + platinum-based CT	Metastatic NSCLC, no sensitizing <i>EGFR</i> or <i>ALK</i> aberrations
Nivolumab + ipilimumab	1L for metastatic NSCLC (PD-L1 ≥1%), no <i>EGFR</i> or <i>ALK</i> aberrations
Nivolumab [†] + ipilimumab + platinum-doublet CT	1L for metastatic/recurrent NSCLC, no <i>EGFR</i> or <i>ALK</i> aberrations

*Single-agent pembrolizumab approved for ≥1% PD-L1 but not broadly recommended by experts; guideline recommended for PD-L1 1%-49% if poor PS or contraindications to combining with CT. [†]Also indicated as 1L treatment for patients with stage III NSCLC who are not candidates for surgical resection or definitive chemoradiation.

Atezolizumab PI. Cemiplimab PI. Durvalumab PI. Nivolumab PI. Pembrolizumab PI.

CARATTERIZZAZIONE DEI MARCATORI PREDITTIVI DI RISPOSTA MEDIANTE NGS

Il numero di biomarcatori predittivi di risposta al trattamento per la stratificazione clinica dei pazienti con NSCLC è in divenire perché il sempre crescente numero di biomarcatori introdotti in pratica clinica aumenta l'elemento di complessità dei laboratori adibiti all'esecuzione dei test molecolari. Se a questo aggiungiamo l'estrema eterogeneità che affligge l'approvazione dei singoli biomarcatori nei singoli Paesi della comunità europea il panorama si arricchisce di ulteriori livelli di complessità. A riguardo, è opportuno distinguere tra i dati di real-life, che derivano dalla pratica clinica, rispetto ai dati degli studi clinici. Lo sviluppo di database come ATLAS permette di sistematizzare le informazioni tecniche, cliniche e molecolari annotate nel database. L'implementazione di database di riferimenti sviluppati con lo scopo di armonizzare la condivisione dei dati supporta la fruibilità da parte dell'oncologo di assetti molecolari complessi caratterizzati dalla presenza di co-mutazioni che impattano sulla storia clinica del paziente. In questo scenario, l'armonizzazione delle procedure analitiche trova massima efficacia nell'analisi di biomarcatori complessi come *MET* che nei prossimi anni vedrà rivoluzionato il proprio ruolo divenendo un marcatore "triplice" di selezione dei pazienti con NSCLC a trattamenti a bersaglio molecolare. Questi studi mostrano che lavorare sul RNA diventa cruciale quando si va a ricercare alte-

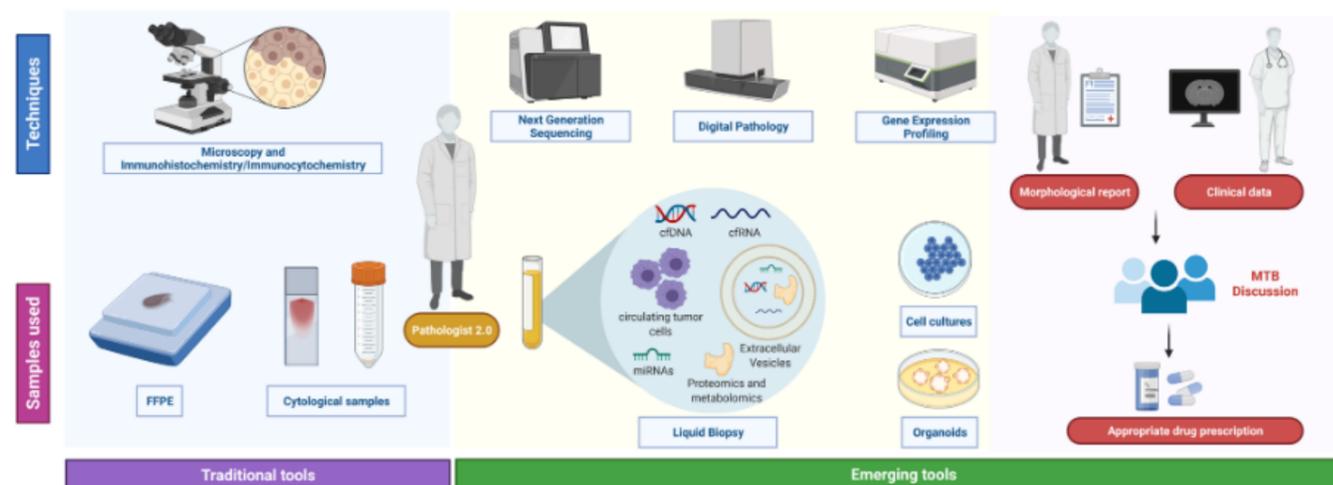
razioni molecolari come traslocazioni aberranti o le mutazioni causative dello skipping dell'esone 14 del gene *MET* contribuendo a definire la funzionalità dell'alterazione molecolare identificata. Davanti all'aumento esponenziale del numero di biomarcatori introdotti in clinica, il tessuto risulta inadeguato per consentire una corretta ed esaustiva profilazione molecolare nel 40.0% dei casi. I campioni tissutali di piccole dimensioni (biopsie o preparati citologici) mostrano adeguatezza comparabile alle resezioni chirurgiche nel predire la risposta terapeutica nei pazienti con NSCLC. La scelta di impiegare in pratica clinica strategie di testing basate sull'utilizzo del sequenziamento genico massivo e parallelo consente una profilazione molecolare esaustiva con una riduzione dei costi complessivi sostenuti rispetto alle tecnologie singleplex quando i biomarcatori sono almeno 4. Nonostante queste migliorie apportate ai protocolli analitici, una buona fetta di pazienti non beneficerebbe di terapie a bersaglio molecolare se tool diagnostici integrativi (biopsia liquida) non fossero stati introdotti in pratica clinica. Nel concetto di biopsia liquida annoveriamo una serie di fonti biologiche liquide da cui è possibile isolare differenti analiti (acidi nucleici, cellule tumorali circolanti, proteine) e che permettono di superare i problemi analitici di gestione del campione tissutale che ancora oggi persistono nella pratica clinica. Sulla scia di questa innovazione è opportuno considerare tessuto e biopsia liquida come aspetti complementari dello stesso percorso diagnostico finalizzato all'acquisizione di dati molecolari spendibili nella pratica clinica. Come conseguenza delle caratteristiche intrinseche alla biopsia liquida, nuovi scenari di management clinico del paziente oncologico hanno svelato le potenzialità applicative della biopsia liquida giustificando l'utilizzo di questa risorsa biologica nei setting iniziali di malattia oppure nell'intercettazione della malattia in pazienti sani.

AUTORE:

PROF. UMBERTO MALAPELLE

Professore Associato, Dipartimento di Sanità Pubblica, Università degli Studi di Napoli "Federico II"

PATHOLOGISTS 2.0: From microscopy to the "digital revolution" and molecular tumor board (MTB)



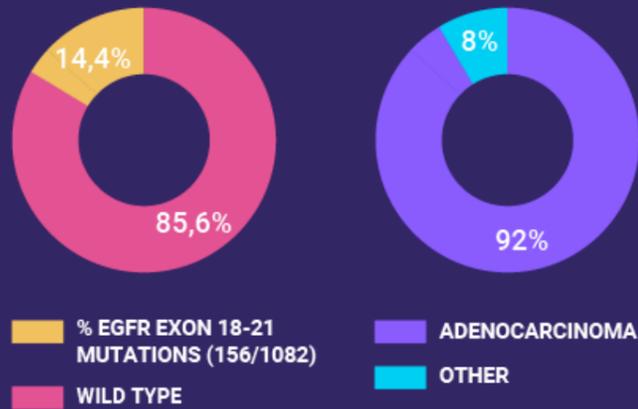
Pisapia P, L'Imperio V, Galuppini F, Sajjadi E, Russo A, Cerbelli B, Frassetto F, d'Amati G, Troncone G, Fassan M, Fusco N, Pagni F, Malapelle U. The evolving landscape of anatomic pathology. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2022; 178:103776.

THE KWAY ITALIAN MULTICENTRE COST EVALUATION STUDY: Study design

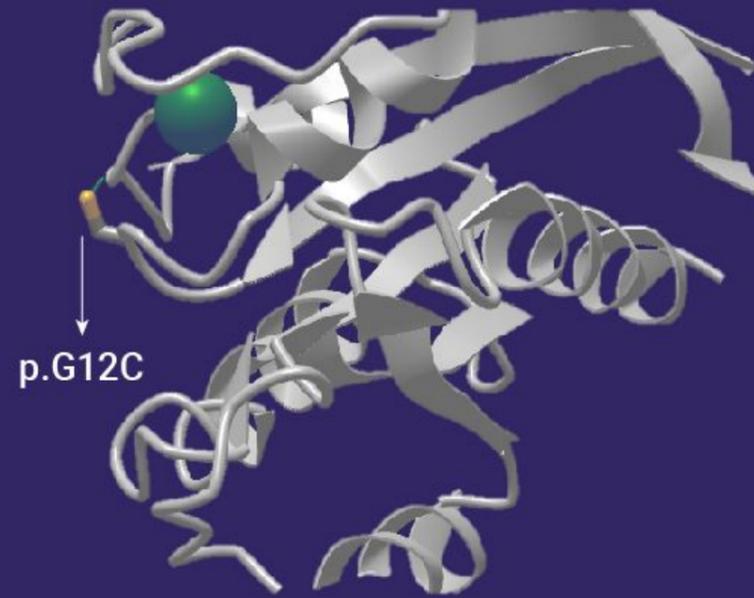




Results



*Data reported from ATLAS coordinator institutions - University of Turin and Naples



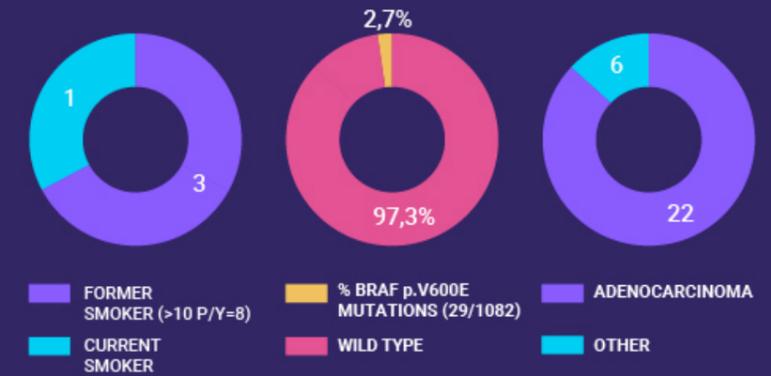
Results



*Data reported from ATLAS coordinator institutions - University of Turin and Naples



Results



*Data reported from ATLAS coordinator institutions - University of Turin and Naples



CASI FORMATIVI “TMB – LIKE”

Sono stati discussi casi clinici che hanno mostrato:

- La fase pre analitica relativa al management del campione biologico, sia esso fluido o tessuto, rappresenta una fase imprescindibile che non può risultare slegata dal percorso analitico-diagnostico. Per quanto concerne il campione tissutale, la scelta del fissativo, il tempo di fissazione e il sezionamento del campione su una postazione dedicata rappresentano buone pratiche di laboratorio che riducono sensibilmente il rate di campioni inadeguati e, in particolare, di generare risultati falsi positivi derivanti da cross contaminazione del materiale biologico. Il campione di sangue periferico necessita di una gestione ancora più accurata rispetto al prelievo tissutale a causa dell'instabilità di cui risentono gli acidi nucleici circolanti. Per tale motivo, la separazione del plasma (che contiene gli acidi nucleici circolanti) deve essere realizzata nel più breve tempo possibile dal prelievo al fine di ridurre risultati falsi negativi che verrebbero generati a causa dell'esiguità del materiale analizzato. A tale riguardo, l'utilizzo di provette contenenti stabilizzanti rappresenta un utile supporto diagnostico nella gestione del prelievo di sangue dai centri satelliti (richiedenti l'analisi) al centro hub (esecutore dell'analisi).

- La quantizzazione e qualificazione degli acidi nucleici estratti rappresenta uno step preordinante per la corretta esecuzione del test molecolare. Le differenti tipologie di campioni che pervengono al laboratorio di biologia molecolare e su cui deve essere avviata l'analisi sono distinguibili in: campio-

ni con alta qualità/quantità degli acidi nucleici (campioni a fresco), campioni con scarsa qualità ed alta quantità degli acidi nucleici (resezioni chirurgiche), campioni con alta qualità e scarsa quantità degli acidi nucleici (campioni citologici), campioni con scarsa qualità/quantità di acidi nucleici (campioni allestiti come cell-block). Per tale motivo, l'analisi quantitativa e qualitativa degli acidi nucleici va incoraggiata e realizzata attraverso piattaforme adeguate alla tipologia di campione in analisi. Nella fase della valutazione quali/quantitativa degli acidi nucleici, le metodiche fluorimetriche e microfluidiche consentono la più corretta valutazione relativa allo status degli acidi nucleici estratti in quanto caratterizzate da una maggiore sensibilità e specificità analitica nella valutazione di frammenti scarsamente rappresentati nel campione biologico.

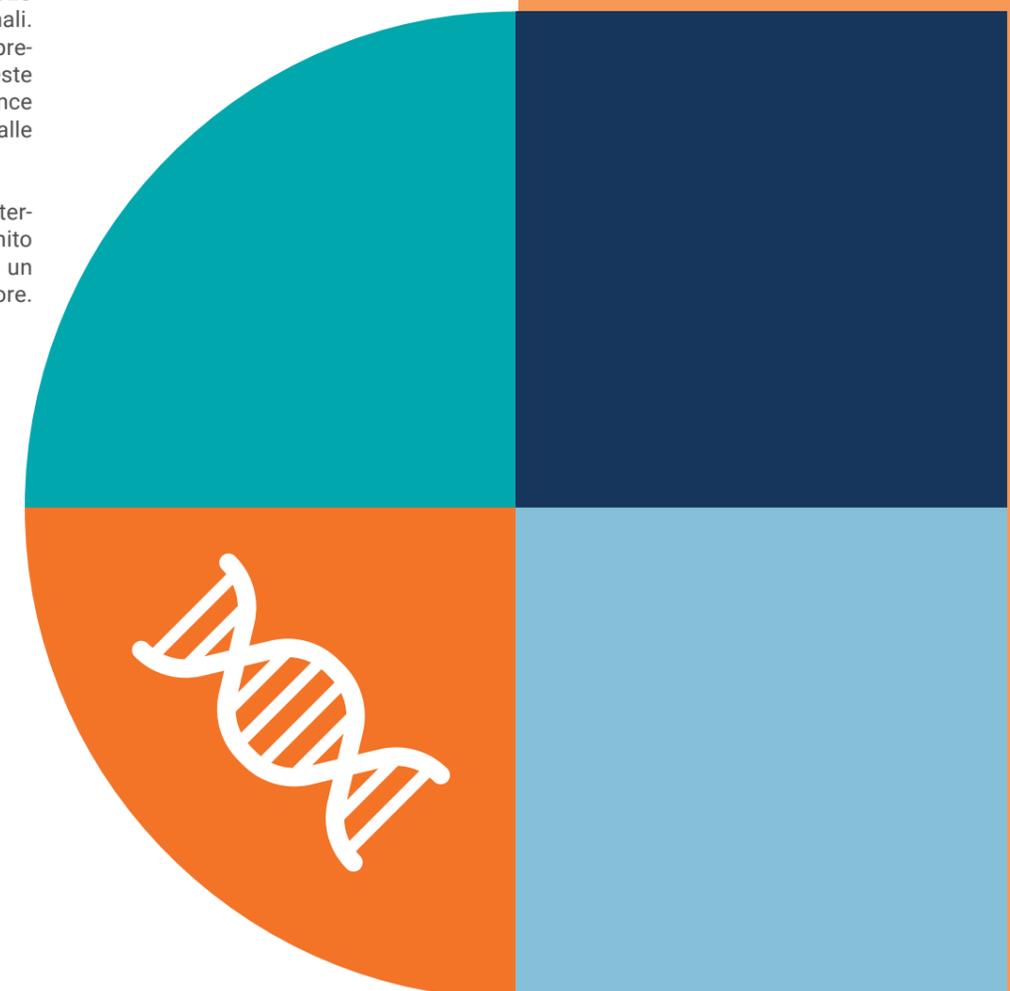
- Le tecnologie finalizzate all'analisi molecolare si dividono in relazione alla tipologia di approccio analitico di cui dispongono. Le tecnologie singleplex permettono l'analisi di una singola alterazione in ogni seduta analitica (*RTPCR*, *dPCR*) mentre le tecnologie multiplex consentono di estendere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

- Un'ulteriore differenza tra queste due macro categorie di approcci tecnici risiede nella possibilità di qualificare le alterazioni riscontrate. I saggi basati su approcci di *RTPCR* sono spesso viziati dall'impossibilità di nomenclare un'alterazione identificando la positività del

campione con un gruppo di alterazioni. Tuttavia, nell'era della medicina di precisione il paradigma “un'alterazione-un biomarcatore” viene soppiantato dal concetto “un'alterazione una terapia” che sottolinea come le differenti alterazioni molecolari che ricadono nello stesso gene hanno un peso specifico differente nel guidare il clinico ad un approccio terapeutico mirato. Infine, ultimo elemento di discussione è stato rappresentato dalle mutazioni classificate come “uncommon”. Queste alterazioni sono caratterizzate da una minore frequenza di insorgenza nel NSCLC rispetto alle mutazioni convenzionali. L'utilizzo di piattaforme di *RTPCR* pregiudica la corretta detection di queste alterazioni a causa del ridotto reference range di queste tecnologie rispetto alle piattaforme di *NGS*.

- I workflow analitici finalizzati all'interpretazione del dato di sequenza fornito dalle piattaforme di *NGS* richiede un corretto training da parte dell'operatore.

Spesso, l'impostazione della pipeline di analisi incongruente con la tipologia di analisi in atto si traduce nella generazione di risultati errati che pregiudicano al paziente la possibilità di accedere ad un trattamento più adeguato sulla base delle caratteristiche molecolari del paziente. L'integrazione tra i software di analisi di primo e di secondo livello rappresenta una soluzione valida per risolvere le problematiche relative all'interpretazione del dato molecolare.



ESERCITAZIONE PRATICA “NGS JOURNEY”

Ciascun partecipante ha preso parte all'esercitazione pratica, svoltasi presso il laboratorio di patologia molecolare predittiva dell'Università degli studi di Napoli Federico II, finalizzata alla valutazione degli aspetti tecnici legati alla processazione del campione biologico e all'esame molecolare volto alla caratterizzazione del profilo mutazionale delle cellule tumorali. Nel dettaglio, sono stati discussi i principali percorsi diagnostici di allestimento del preparato cito-istologico.

Successivamente, sono state descritte le procedure estrattive manuali ed automatizzate per il recupero e la purificazione degli acidi nucleici da tessuto e da sangue. Infine, sono state analizzati in dettaglio i percorsi analitici basati sull'impiego di tecnologie di NGS con particolare rilevanza alla fase interpretativa del dato di sequenza realizzata attraverso software di analisi di primo e di secondo livello.

Per ciascuna fase dell'esercitazione pratica, i partecipanti all'evento hanno assistito e attivamente preso parte alle attività poste in essere e hanno collegialmente discusso la propria esperienza in merito agli aspetti tecnici della profilazione molecolare. Sono state, infine, discusse ed analizzate le peculiarità analitiche di ciascun centro in ottica di evidenziare le criticità che riducono l'efficienza analitica per la caratterizzazione molecolare dei biomarcatori predittivi della pratica clinica.

TAKE HOME MESSAGE

- La fase pre-analitica di gestione del campione tissutale e/o del prelievo di sangue periferico rappresenta un aspetto cruciale nel percorso diagnostico del paziente con NSCLC.
- Nel contesto dei pazienti affetti da NSCLC, il prelievo tissutale risulta spesso rimaneggiato in termini di qualità e quantità di acidi nucleici ricavabili. L'impiego di piattaforme di NGS di permettono un'analisi multi-comprensiva dei biomarcatori della pratica clinica e consegnando all'oncologo un'informazione più pertinente possibile rappresentativa dell'assetto molecolare della neoplasia.
- L'utilizzo di pipeline bioinformatiche ottimizzate e standardizzate per l'interpretazione del dato molecolare è fondamentale per la corretta interpretazione del dato. L'integrazione di algoritmi analitici di primo e di secondo livello consente una più adeguata gestione del risultato molecolare in particolar modo nei casi dove la qualità dell'analisi molecolare è pregiudicata a causa delle caratteristiche del campione biologico.
- L'armonizzazione delle procedure analitiche si sviluppa attraverso la continua formazione di personale qualificato nella gestione del campione biologico dalla fase pre-analitica all'interpretazione del dato molecolare.
- Il momento della refertazione, vissuto collegialmente nell'ambito di un team multidisciplinare dove confluiscono vari interlocutori con differenti expertise, rappresenta il momento ultimo delle procedure analitiche e deve essere orientato alla generazione di un report analitico di immediata comprensione per il clinico che amministra il paziente oncologico.

REFERENZE

1) Kerr KM, Bibeau F, Thunnissen E, Botling J, Ryška A, Wolf J, Öhrling K, Burdon P, Malapelle U, Büttner R. The evolving landscape of biomarker testing for non-small cell lung cancer in Europe. *Lung Cancer*. 2021;154:161-175

2) Malapelle U, Mayo de-Las-Casas C, Rocco D, Garzon M, Pisapia P, Jordana-Ariza N, Russo M, Sgariglia R, De Luca C, Pepe F, Martinez-Bueno A, Morales-Espinosa D, González-Cao M, Karachaliou N, Viteri Ramirez S, Bellevicine C, Molina-Vila MA, Rosell R, Tronccone G. Development of a gene panel for next-generation sequencing of clinically relevant mutations in cell-free DNA from cancer patients. *Br J Cancer*. 2017;116:802-810

3) Malapelle U, Pepe F, Pisapia P, Sgariglia R, Nacchio M, De Luca C, Lacciamita R, Tommasi S, Pinto R, Palomba G, Palmieri G, Vacirca D, Barberis M, Bottillo I, Grammatico P, Grillo LR, Costa V, Smeraglio R, Bruzzese D, Tronccone G. Harmonization of Next-Generation Sequencing Procedure in Italian Laboratories: A Multi-Institutional Evaluation of the SiRe® Panel. *Front Oncol*. 2020;10:236



Progetto realizzato con il contributo non condizionante di

