



BIOPSIA LIQUIDA: LO STATO DELL'ARTE E LE SUE PROBLEMATICHE

A cura di:

Lucio Buffoni, Susanna Cappia, Luisella Righi, Giulia Siravegna, Claudia Veggiani

Approvato dal Gruppo di Studio sulla Patologia Molecolare

Partecipanti:

Susanna Cappia, Laura Casorzo, Andrea Castelli, Massimo Di Benedetto, Patrizia Agnese Falcone, Paola Francia di Celle, Doriana Giustetto, Genny Jocollé, Antonella Maffè, Caterina Marchiò, Narciso Mariani, Sara Orecchia, Roberta Patetta, Maria Scatolini, Francesca Schillaci, Stefano Taraglio, Silvana Ungari, Claudia Veggiani, Tiziana Venesio, Ludovica Verdun di Cantogno

GRUPPO DI PATOLOGIA MOLECOLARE RETE ONCOLOGICA PIEMONTE E VALLE D'AOSTA LA BIOPSIA LIQUIDA. STATO DELL'ARTE E CRITICITA'

Il Gruppo di Patologia Molecolare nell' incontro dell' 8 ottobre 2018 ha affrontato il tema dell'analisi mutazionale condotta su DNA libero circolante isolato dal plasma comunemente definito "biopsia liquida". Il tema è stato già discusso negli anni precedenti durante i quali i laboratori si stavano attrezzando a svolgere questo tipo di analisi con particolare attenzione alla ricerca di mutazioni di resistenza in pazienti con neoplasia polmonare soggetti a trattamento con inibitori TK. A fine 2016 furono stilate dal Gruppo le Raccomandazioni all'indicazione della Biopsia Liquida e un vademecum tecnico metodologico per i laboratori. A distanza di un paio di anni ci troviamo a rivedere questo tipo di attività tenendo conto delle competenze raggiunte e degli sviluppi che le tecnologie applicate alla biopsia liquida hanno avuto.

Abbiamo invitato la Dr.ssa Giulia Siravegna del laboratorio di Oncologia Molecolare dell'IRCCS Candiolo che è stato il precursore degli studi sulla biopsia liquida e della sua applicazione clinica con particolare riferimento alle neoplasie coloretali. Qui di seguito è presentata la sua approfondita relazione sugli sviluppi tecnici e metodologici cui ha direttamente partecipato e le implicazioni cliniche che ne sono scaturite e che rappresentano una nuova frontiera dell'oncologia.

Nella seconda parte dell'incontro abbiamo cercato di rivisitare l'attività che svolgiamo di routine sulla biopsia liquida nell'ambito della diagnostica molecolare dei tumori polmonari condividendo le nostre esperienze con il Dr. Lucio Buffoni e la Dott.ssa Luisella Righi rispettivamente oncologo e patologo presso l'AOU San Luigi di Gonzaga di Orbassano notoriamente impegnato sul fronte dell'Oncologia Polmonare. Le relazioni che seguono sono il frutto della loro collaborazione con il biologo molecolare (Dott.ssa Susanna Cappia) e nascono dalla nostra esigenza di individuare le problematiche e criticità del metodo e della sua applicazione oltre che analizzare in campo reale i risultati in una casistica numerosa e omogenea con le evidenze cliniche che ne conseguono.

L'ultima parte del documento che presentiamo riguarda l'utilizzo dei tubi stabilizzatori per la conservazione della biopsia liquida per i pazienti che afferiscono ad Aziende Ospedaliere che non dispongono del laboratorio in grado di plasmare il campione entro 2 ore dal prelievo come previsto nelle raccomandazioni. E' stato richiesto un supporto economico alla Rete per introdurre questa pratica e il laboratorio che ne ha maggiormente beneficiato per ragioni di organizzazione dell'attività clinica dell' area è il centro di Novara che ha steso un breve resoconto.

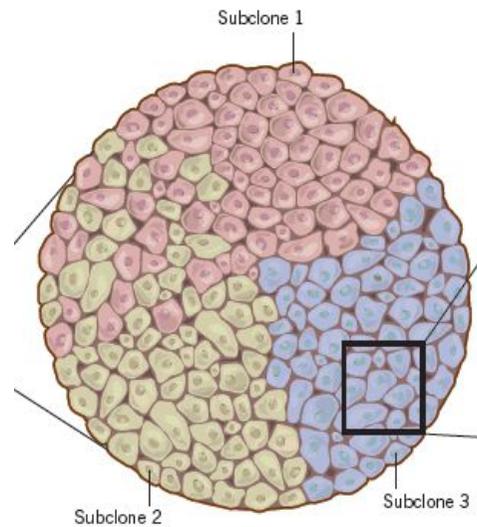
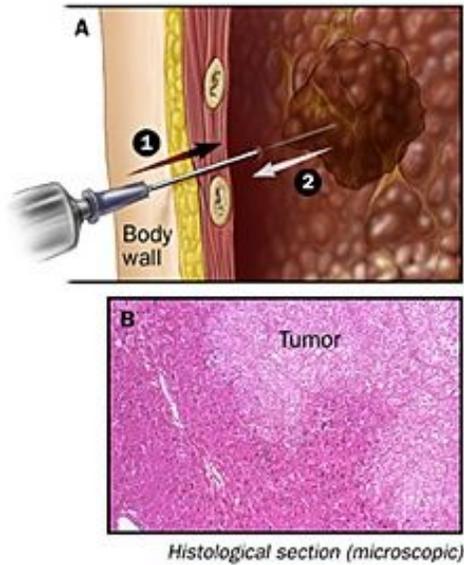
Biopsia liquida: lo stato dell'arte e le sue problematiche

Giulia Siravegna, PhD

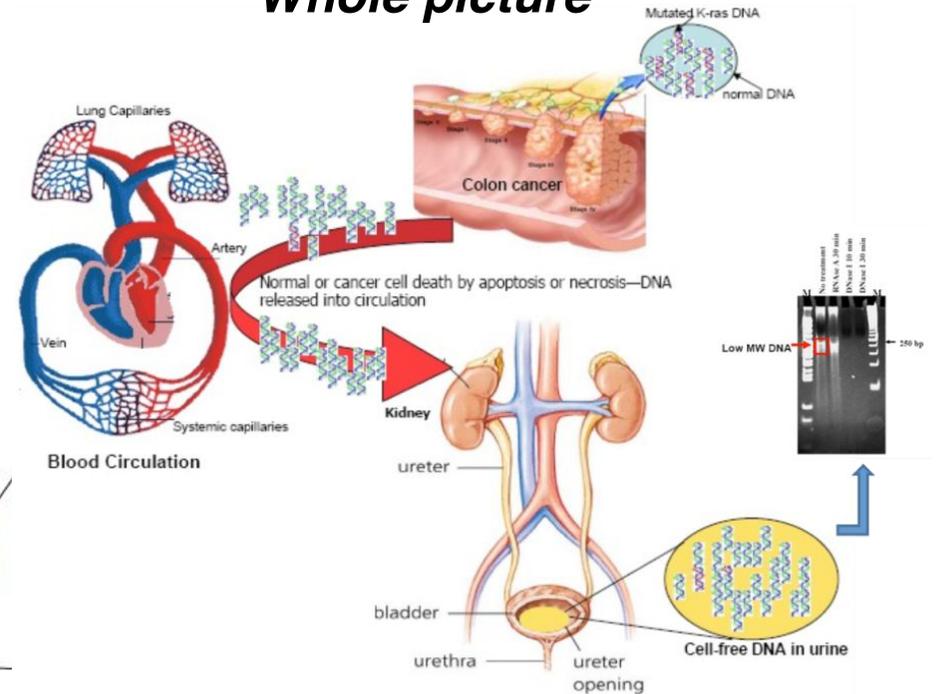
IRCCS Candiolo Cancer Institute
Fondazione del Piemonte per l'Oncologia
Università di Torino

SAMPLING ISSUES

Single snapshot



Whole picture



Invasive

Availability of representative biopsies

Sample size: need to balance signal-to-noise ratios

Quantity and quality problems: micro dissection and DNA damage

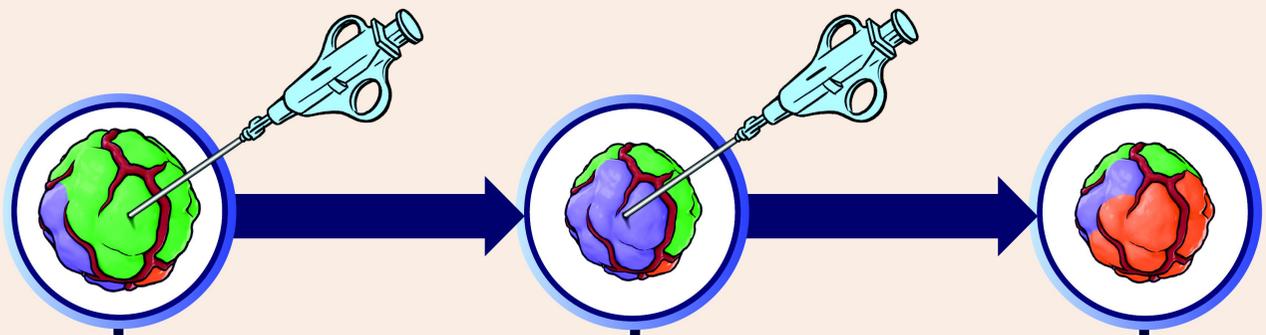
Non invasive

Simple to collect

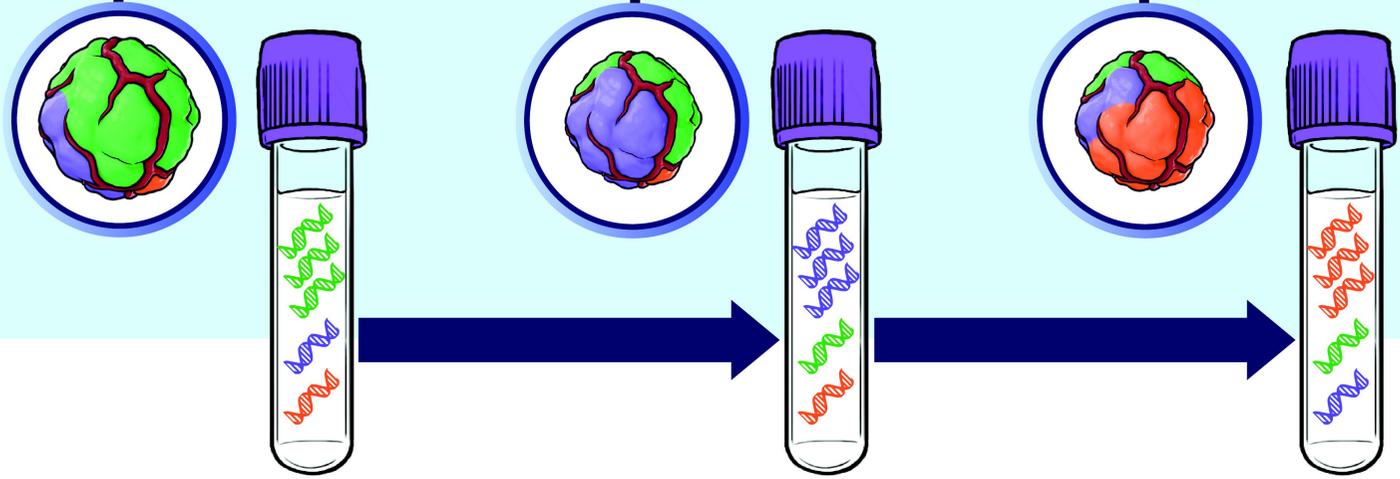
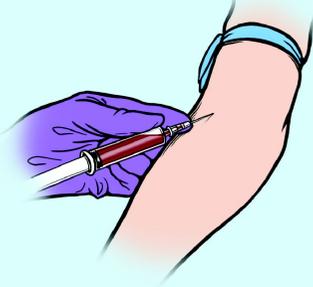
Quantity and quality problems

Representation bias

Tissue Biopsy



Liquid Biopsy



Targeted Therapy Subsequent Therapy

In blood *veritas*

DIAGNOSIS:

genotyping cfDNA in the blood to determine the tumor profile

SURGERY:

tumor cfDNA is not present, the patient is disease free

RESISTANCE:

emergence of genetic alterations associated with drug resistance

MINIMAL RESIDUAL DISEASE:

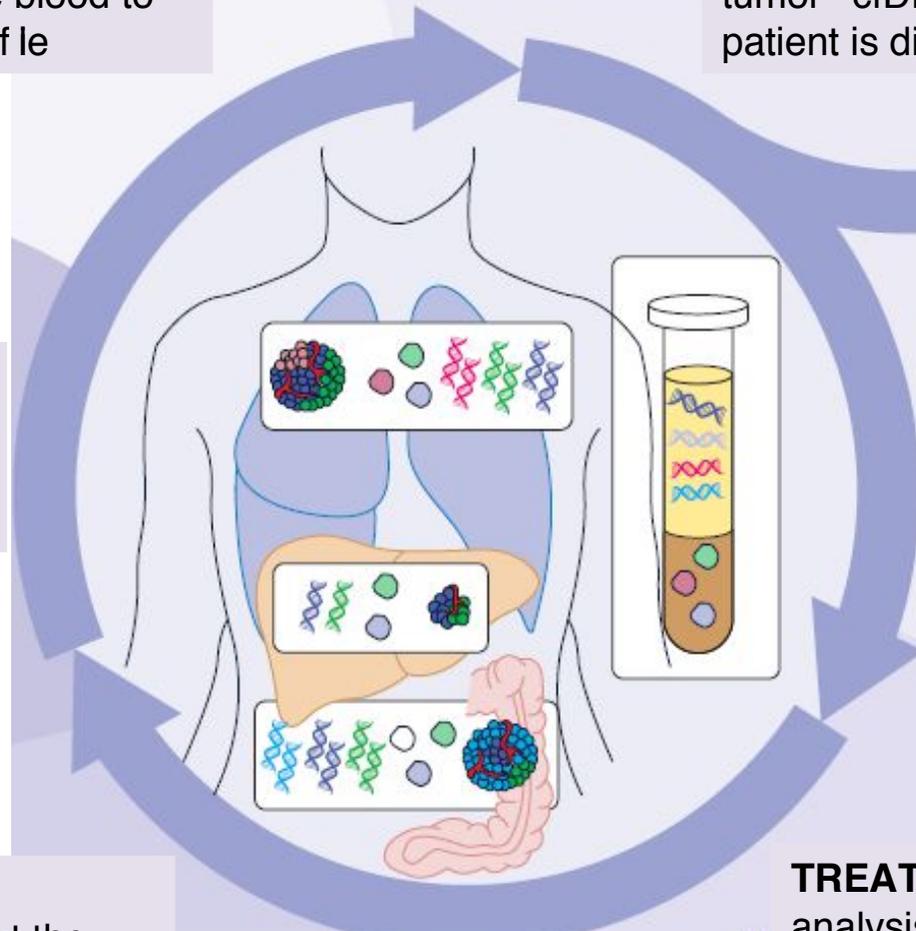
tumor cfDNA is still present in the circulation

FOLLOW UP:

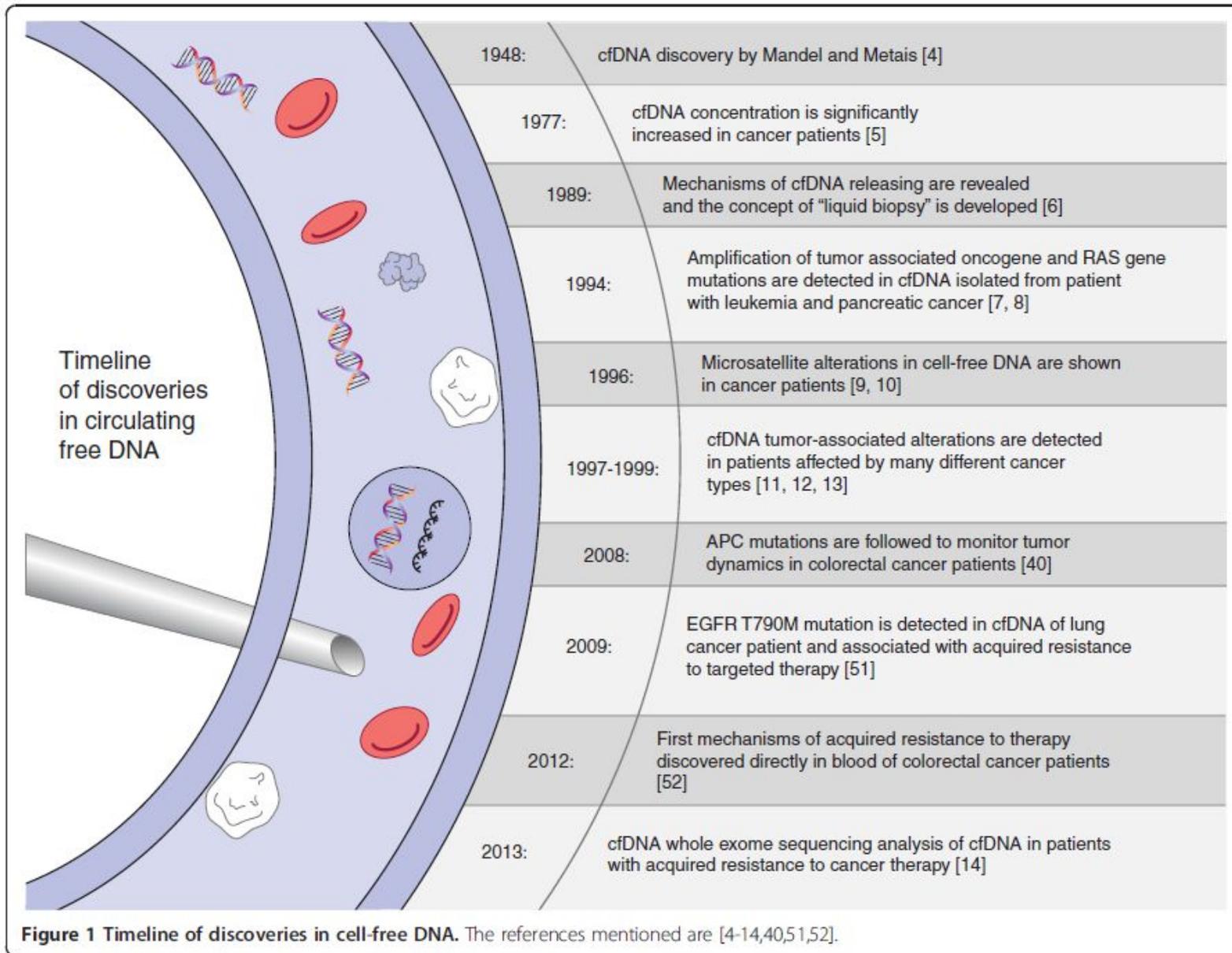
patient monitoring throughout the treatment course to assess response and resistance

TREATMENT:

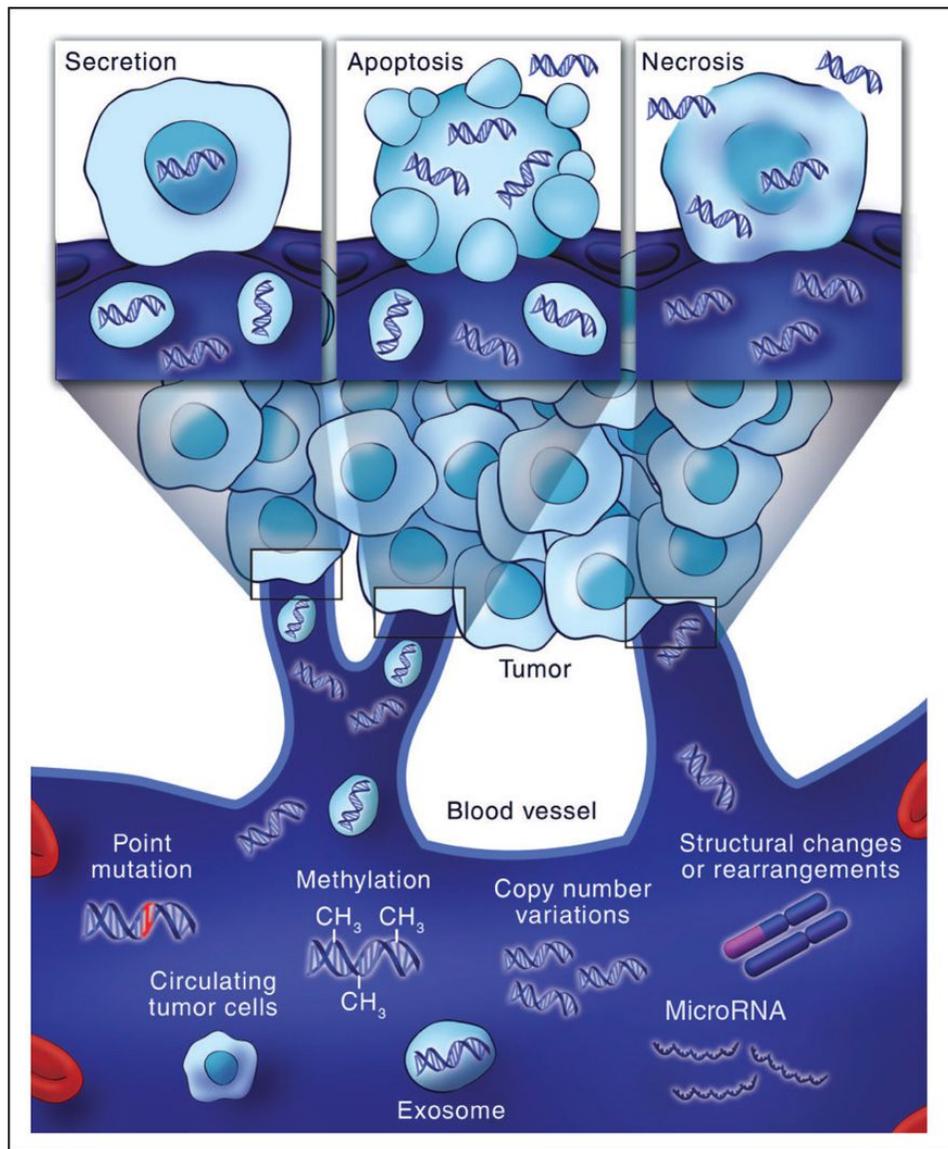
analysis tumor cfDNA for real time monitoring of response to treatment



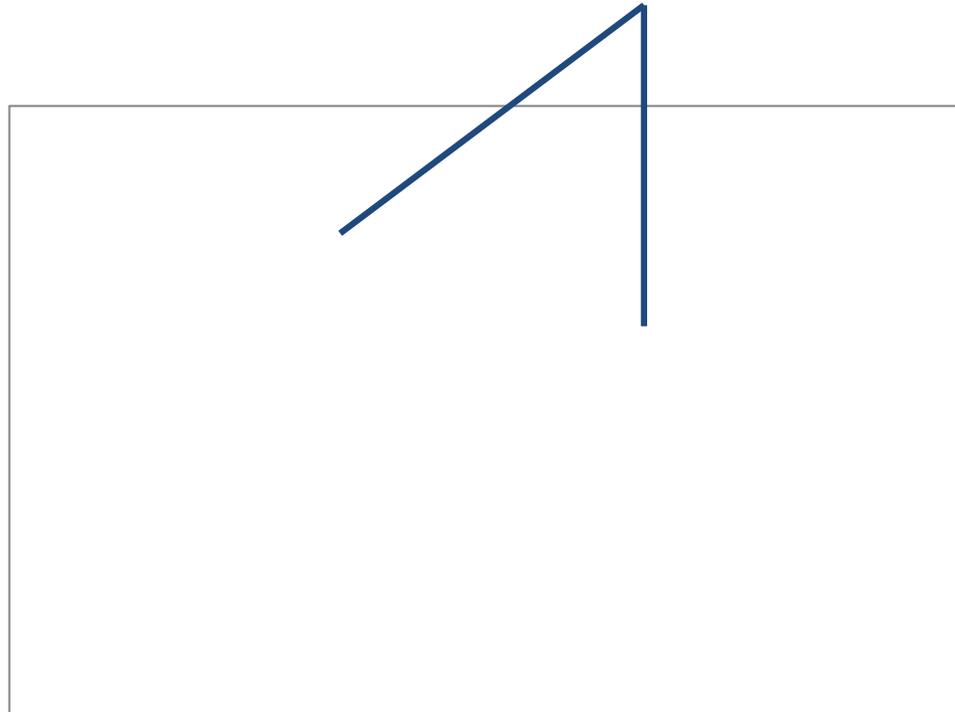
Timeline of discoveries in cell-free DNA



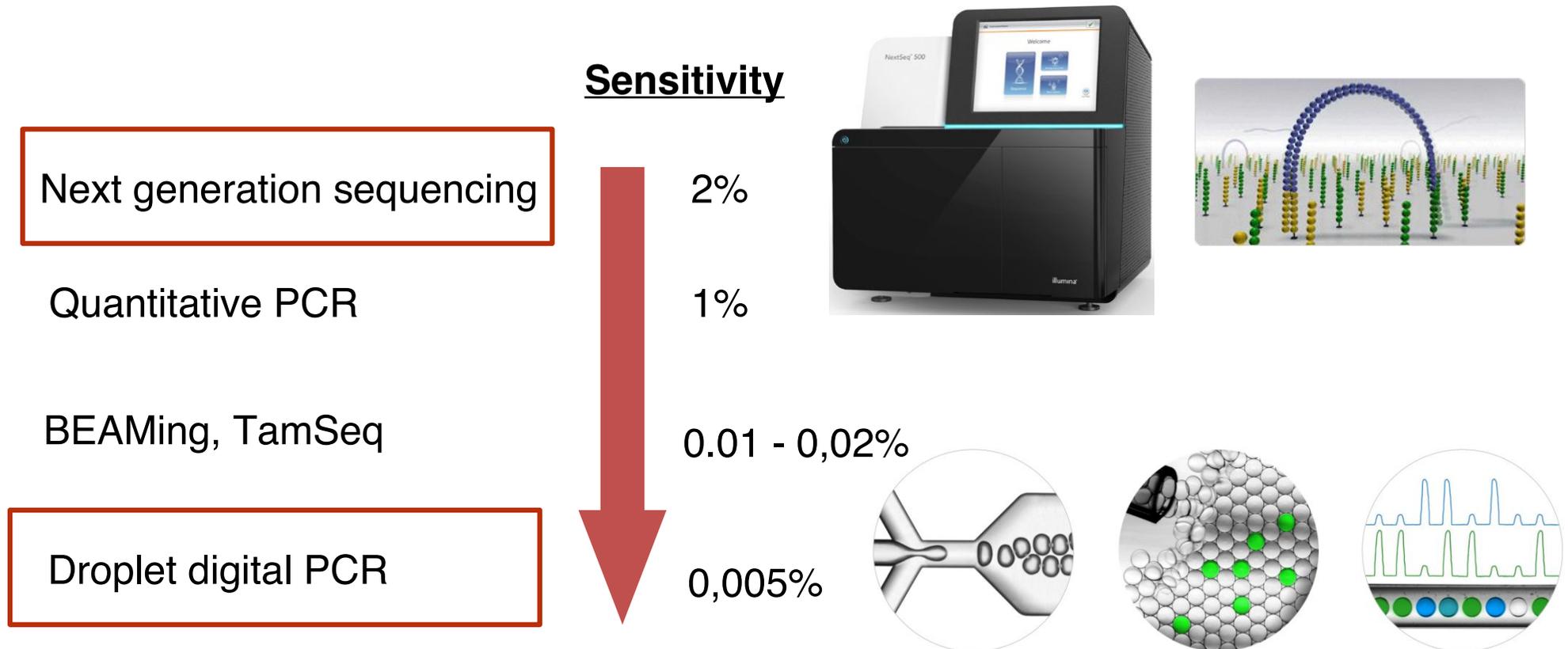
tfDNA & cfDNA



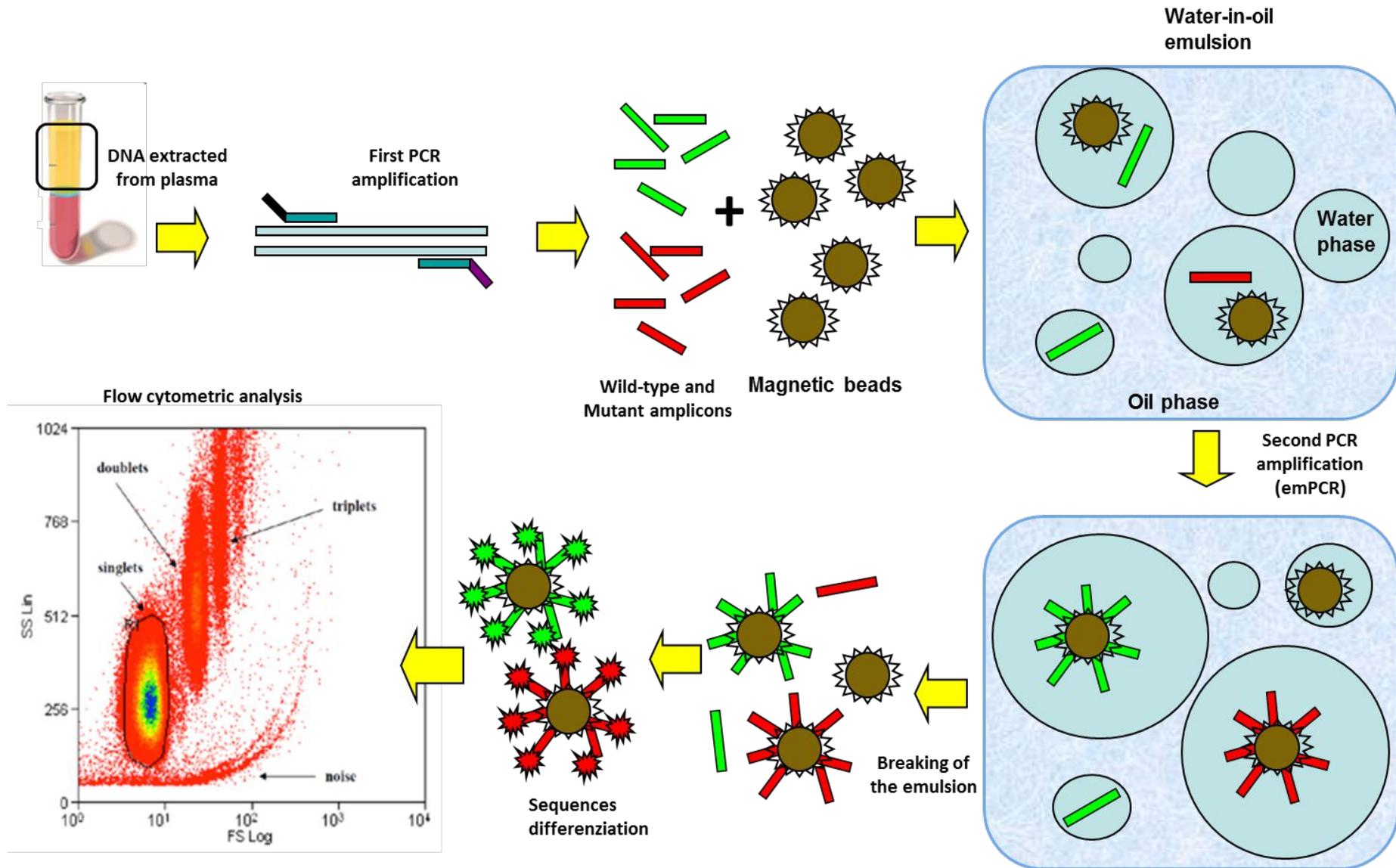
Tumor fractions
ranging from
0,1% to 90%



Technologies for profiling circulating tumor DNA



Digital PCR: BEAMing technology (Beads, Emulsion, Amplification and Magnetics)



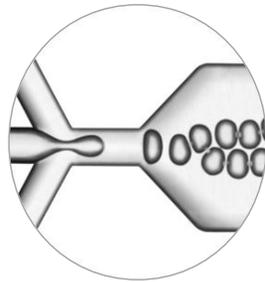
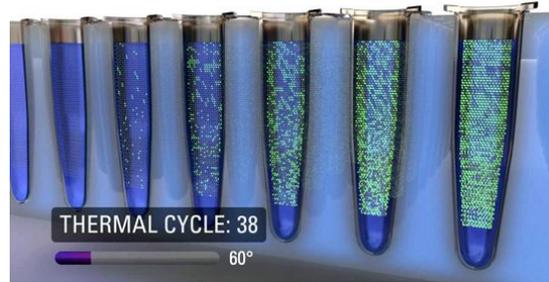
Point mutations and short indels only

Droplet Digital PCR

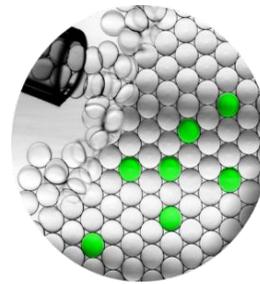
(ddPCR)



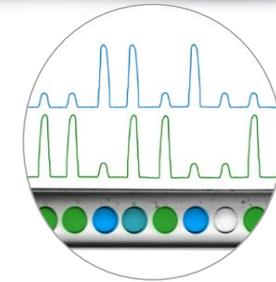
DNA sample



Make Droplets



Amplify



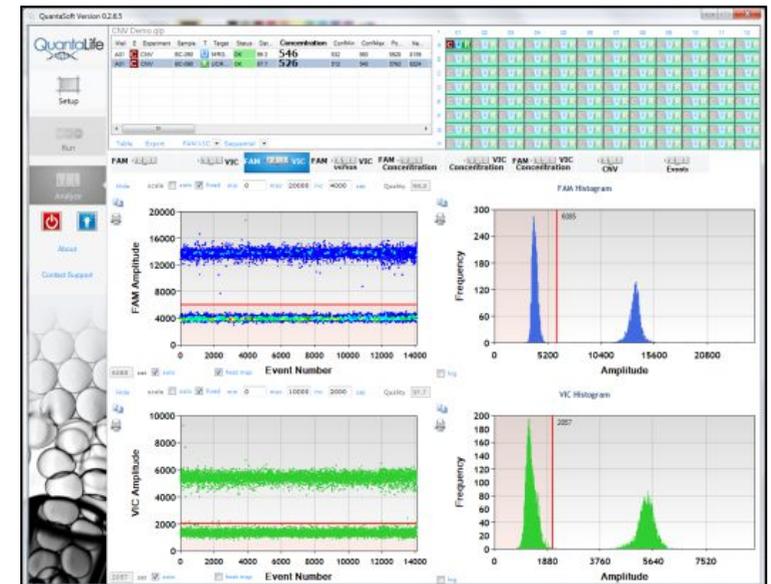
Read and analyze

Point mutations

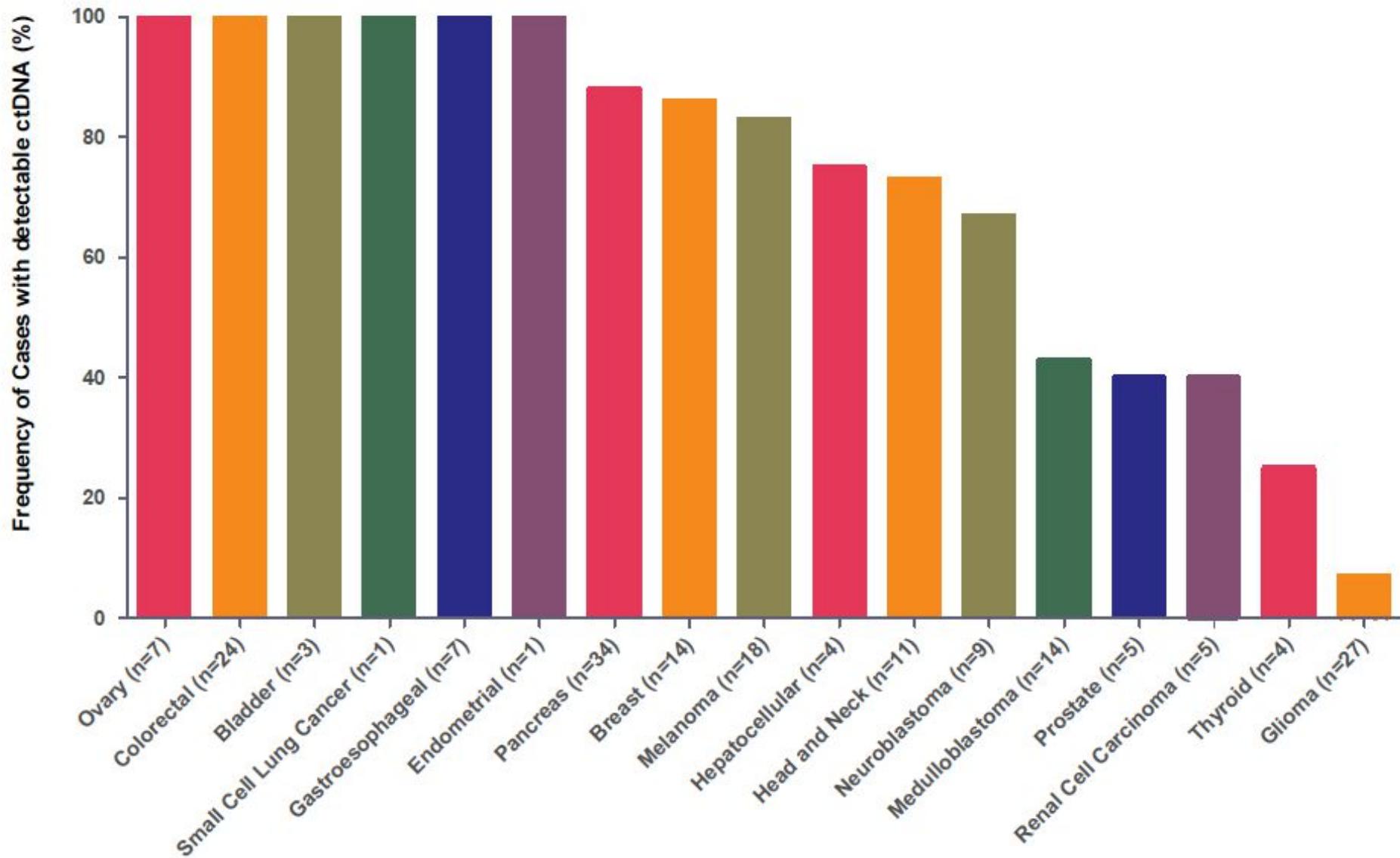
Short indels

Copy number variation

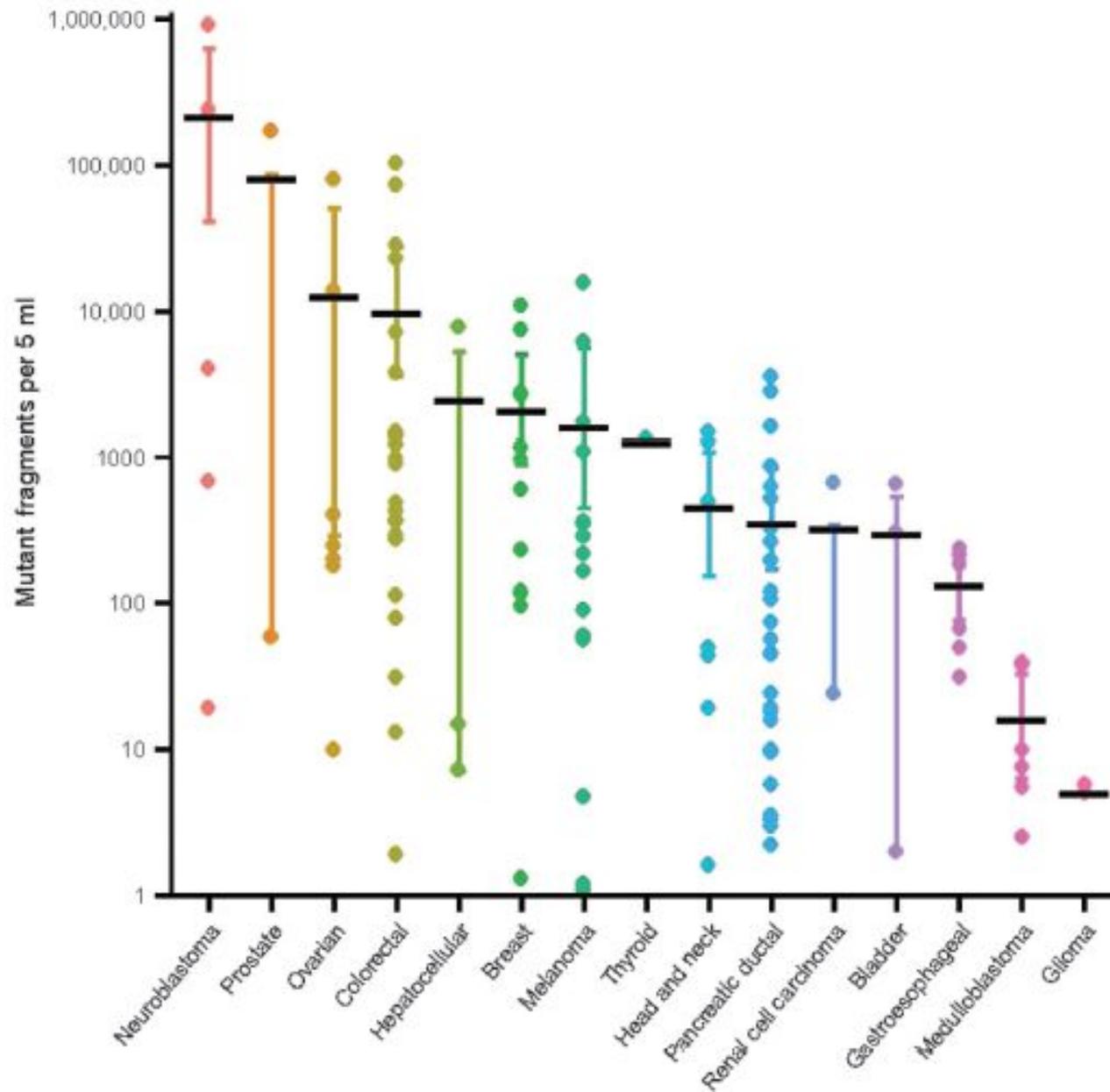
NGS library quantification



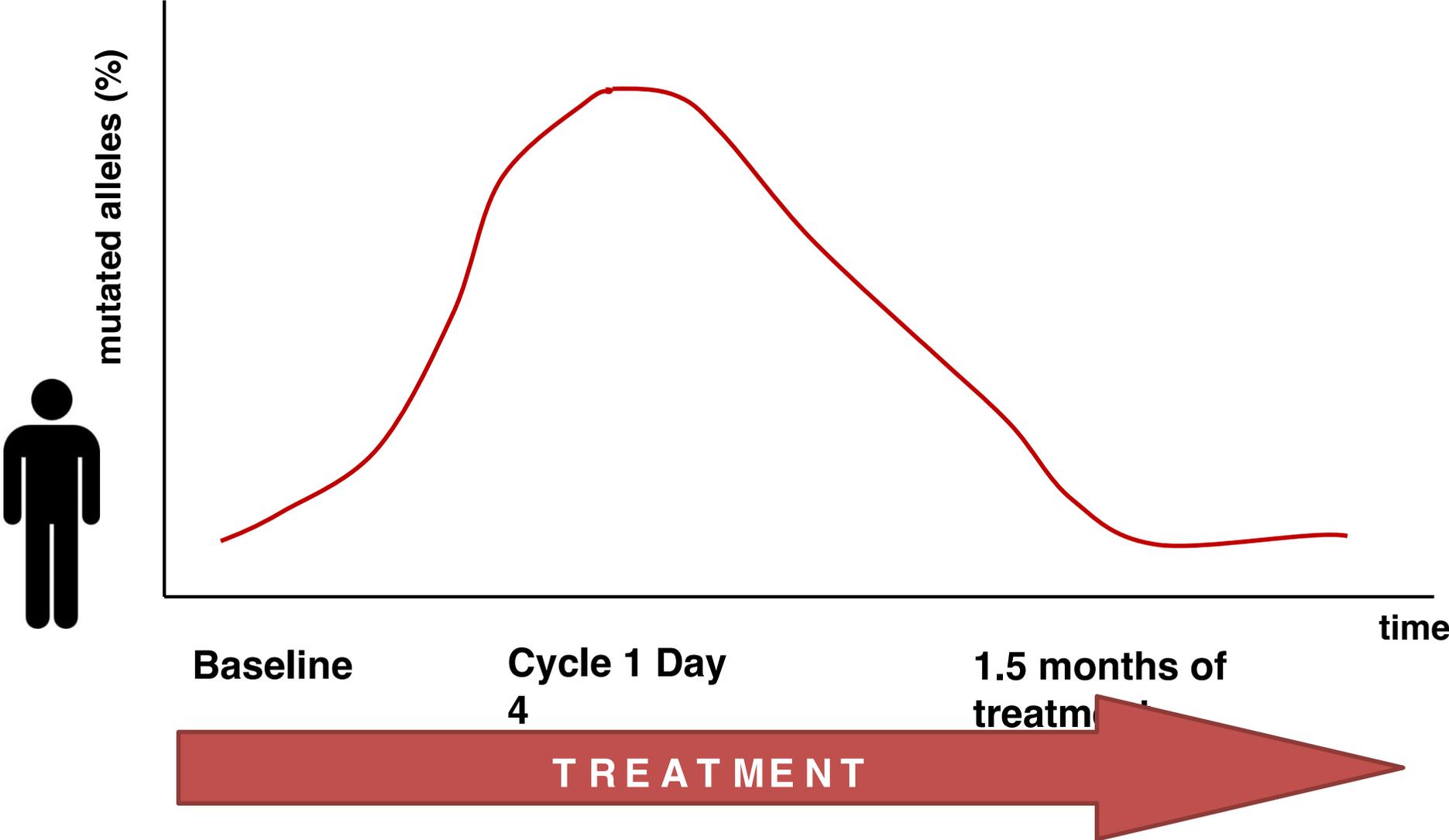
Cell-free circulating tumor DNA levels in different cancer types



Cell-free circulating tumor DNA levels in different cancer types



tfDNA and therapy cycles



Quantification of cfDNA

Pre-analytical conditions impairing tumor-derived cfDNA concentration and detection

- ❖ time intervals to plasma isolation
- ❖ Cares of blood samples
- ❖ different preservatives in blood collection tubes



- **contamination from lysed leukocytes**
- **ctDNA degradation**

Quantification of cfDNA

- Quality check: DNA fragments distribution & Nanodrop
- Real time qPCR
- Qubit

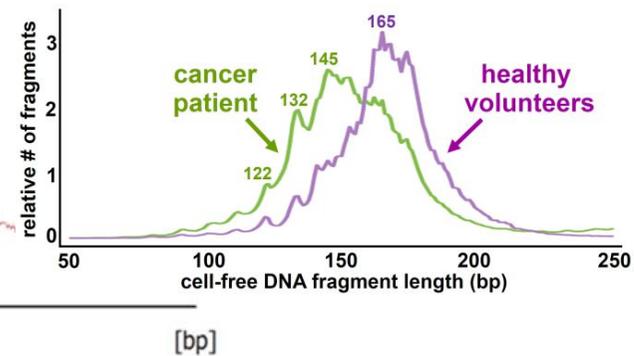
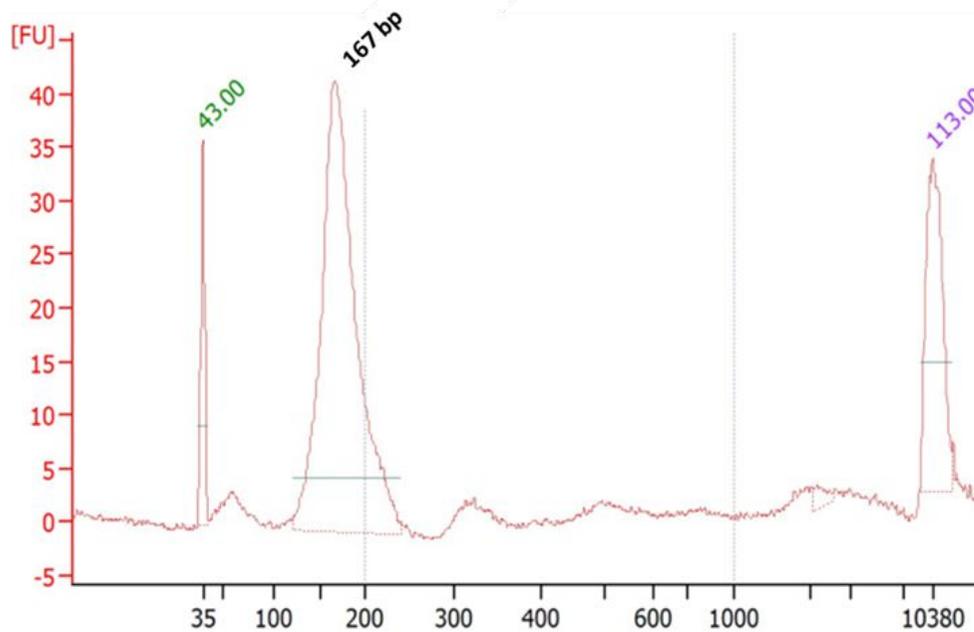
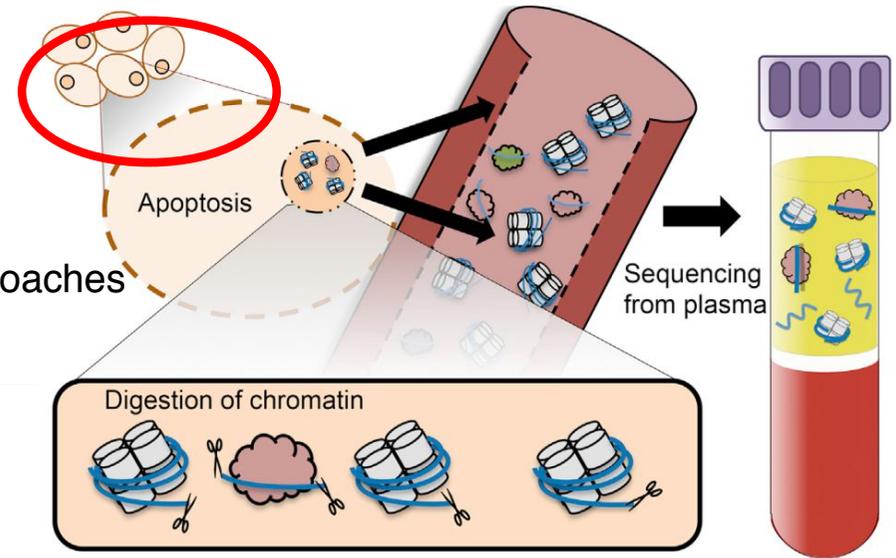
Quantification of cfDNA

- Quality check: DNA fragments distribution & Nanodrop
- Real time qPCR
- Qubit

Quantification of cfDNA

2100 Bioanalyzer High Sensitivity DNA assay

- ❖ DNA Quality
- ❖ Fragments size distribution
- ❖ Contamination from lysed leukocytes
- ❖ Recommended with Next Generation Sequencing approaches

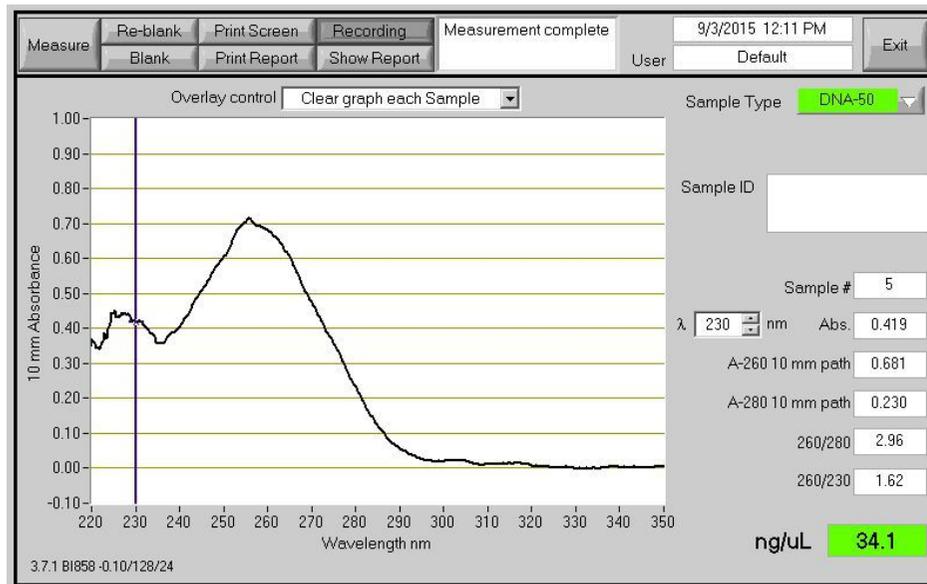


Quantification of cfDNA

NanoDrop Spectrophotometers

- Lacks of sensitivity for cfDNA quantification

- 260/280 & 260/230 ratios



Quantification of cfDNA

- Quality check: DNA fragments distribution & Nanodrop
- Real time qPCR
- Qubit

Quantification of cfDNA

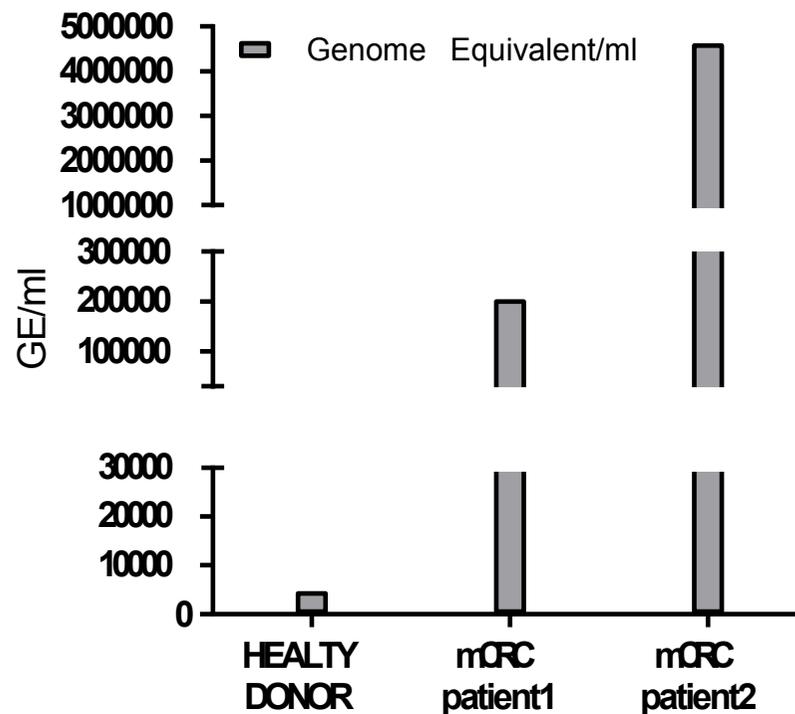
Real time qPCR

- ❖ **RNAse P gene**
- ❖ **Beta-globin gene**
- ❖ **LINE-1 gene**
- ❖ **ALU sequence**

Quantification of cfDNA

Genome Equivalent /ml quantification → **LINE1 gene**

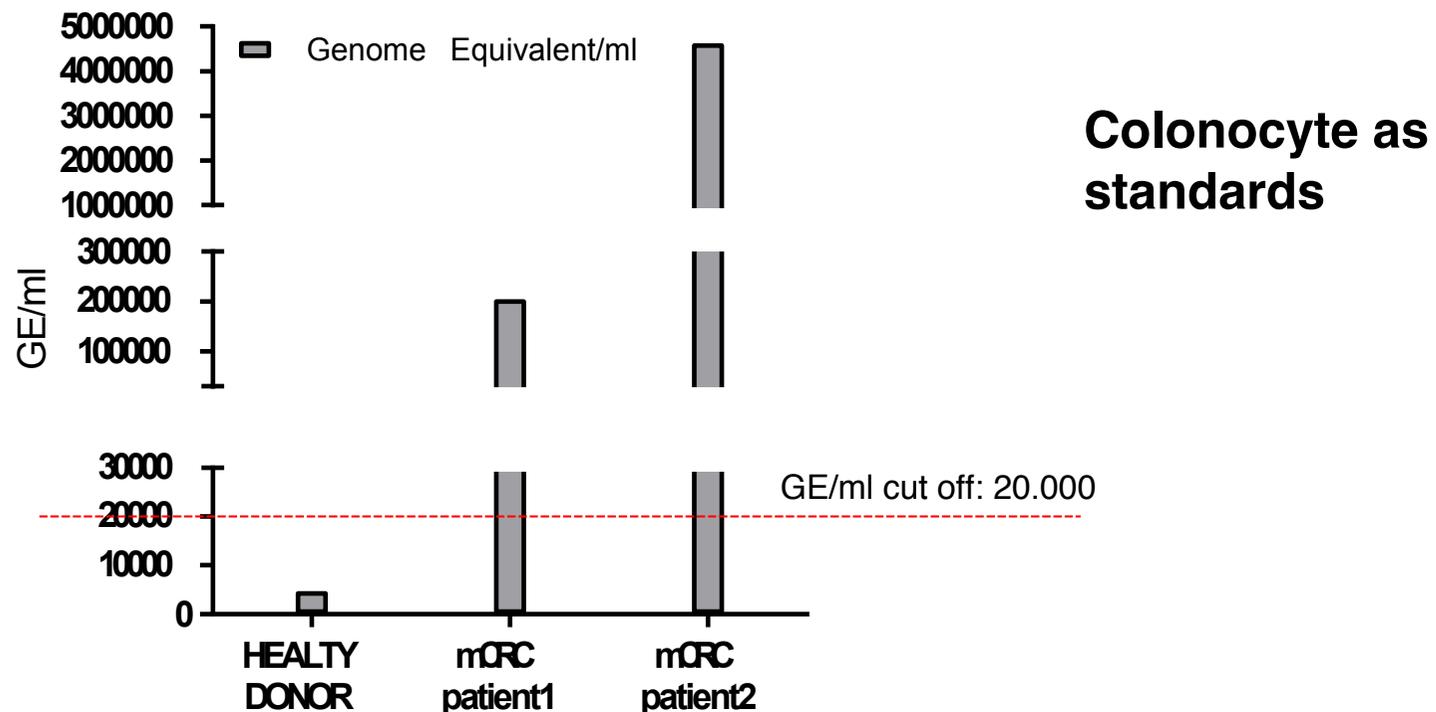
- ❖ estimation of the total number of plasma circulating DNA fragments by real-time PCR
- ❖ human long interspersed nuclear element-1 (*hLINE-1*) retrotransposon family members
- ❖ 100,000 of these elements exist in the human genome



Quantification of cfDNA

Genome Equivalent /ml quantification → **LINE1 gene**

- ❖ estimation of the total number of plasma circulating DNA fragments by real-time PCR
- ❖ human long interspersed nuclear element-1 (*hLINE-1*) retrotransposon family members
- ❖ 100,000 of these elements exist in the human genome



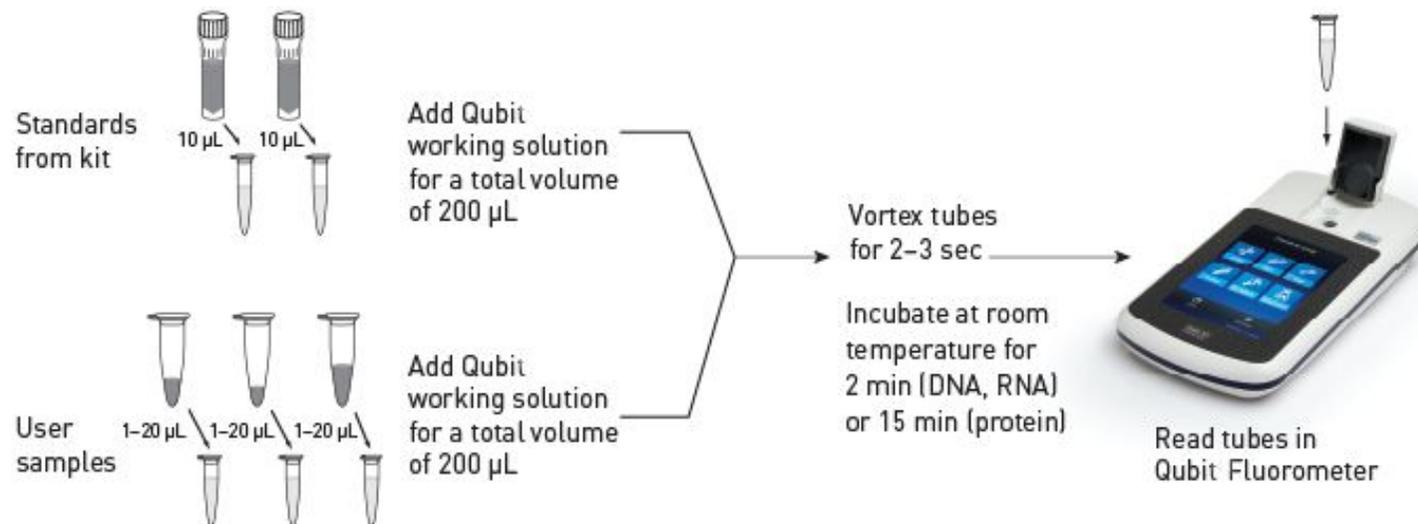
Quantification of cfDNA

- Quality check: DNA fragments distribution & Nanodrop
- Real time qPCR
- Qubit

Quantification of cfDNA

Qubit™ 3.0 Fluorometer

- ❖ The concentration of the target molecule in the sample is reported by a fluorescent dye
- ❖ Uses as little as 1 µL of sample
- ❖ Recommended with Next Generation Sequencing approaches



Quantification of cfDNA

Qubit™ 3.0 Fluorometer

Liquid Biopsy bank @ Candiolo
IRCCS

- 1400 plasma-derived cfDNA

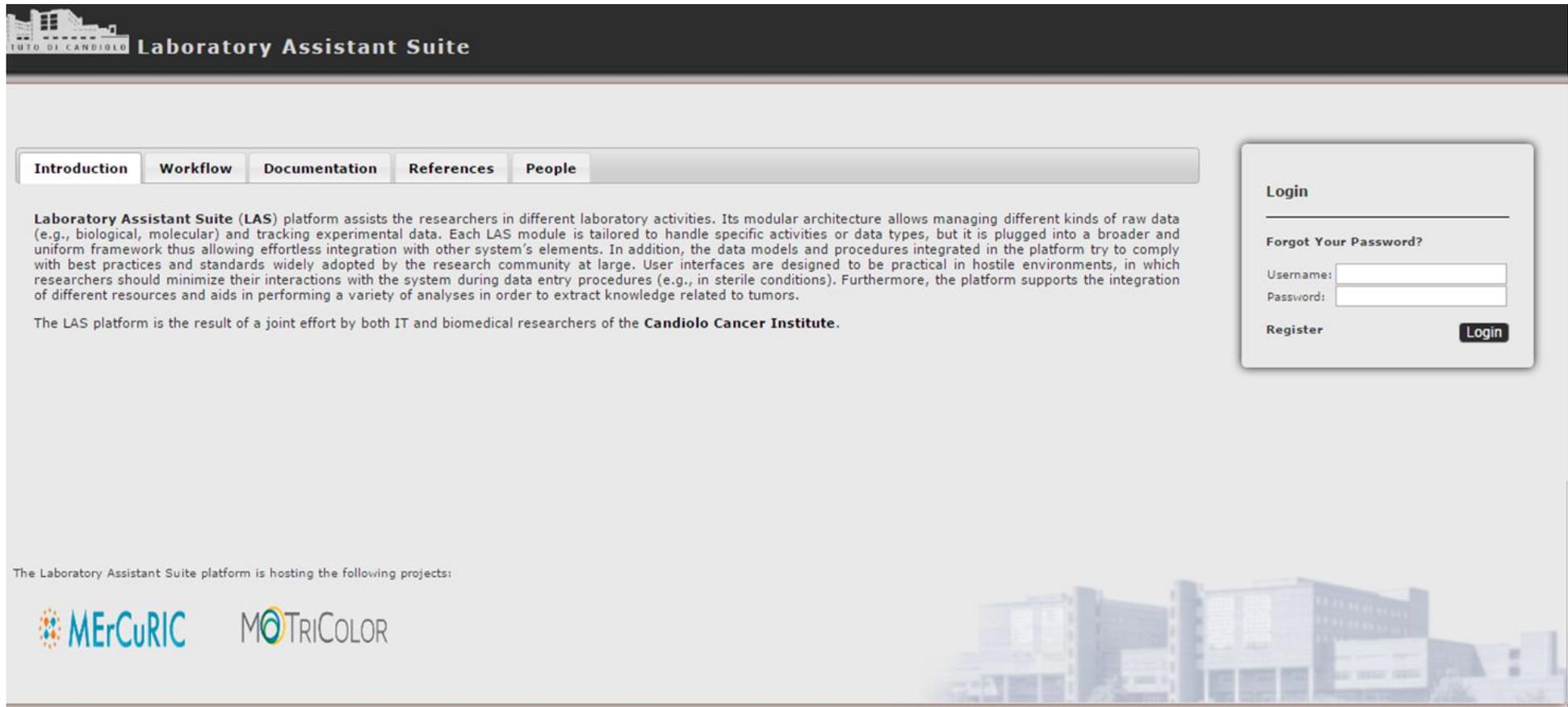
- 144 serum-derived cfDNA



1ml plasma →
70ng

mCRCs patients
with liver mets >
2cm

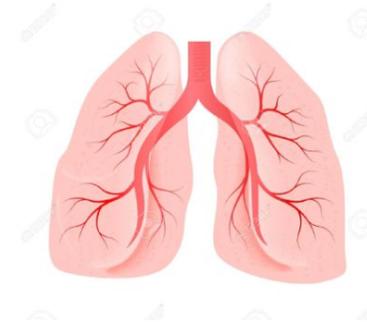
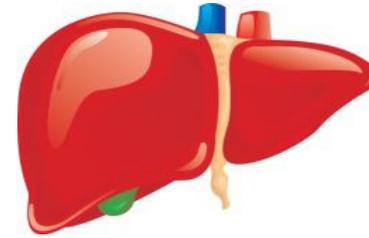
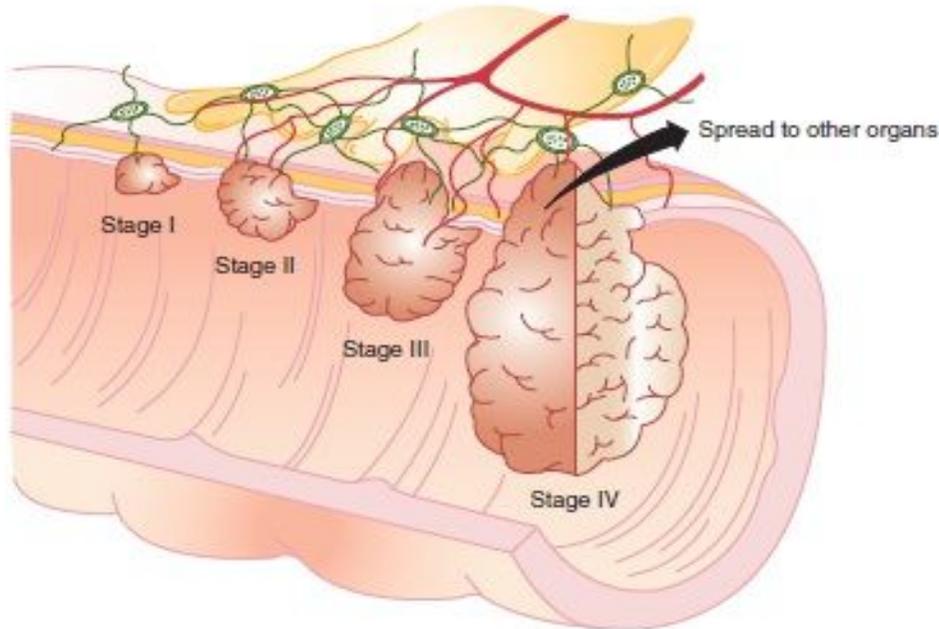
Plasma Biobank database



The screenshot shows the Laboratory Assistant Suite (LAS) website. At the top left, there is a logo for 'TUTO DI CANDIOLLO' and the text 'Laboratory Assistant Suite'. Below this is a navigation menu with tabs for 'Introduction', 'Workflow', 'Documentation', 'References', and 'People'. The 'Introduction' tab is selected. The main content area contains a paragraph describing the LAS platform, its modular architecture, and its use in managing raw data. Below this is a line of text stating that the LAS platform is the result of a joint effort by IT and biomedical researchers of the Candiolo Cancer Institute. On the right side, there is a login form with fields for 'Username:' and 'Password:', a 'Forgot Your Password?' link, and a 'Login' button. Below the login form, there is a 'Register' button. At the bottom left, there is a section titled 'The Laboratory Assistant Suite platform is hosting the following projects:' with logos for 'MErCuRIC' and 'MOTrICOLOR'. The background of the page features a faint image of a modern building.

- The Laboratory Assistant Suite (LAS) platform is designed to assist the researchers of biological and biomedical laboratories in their activities
- Management of biological samples and associated pathological information

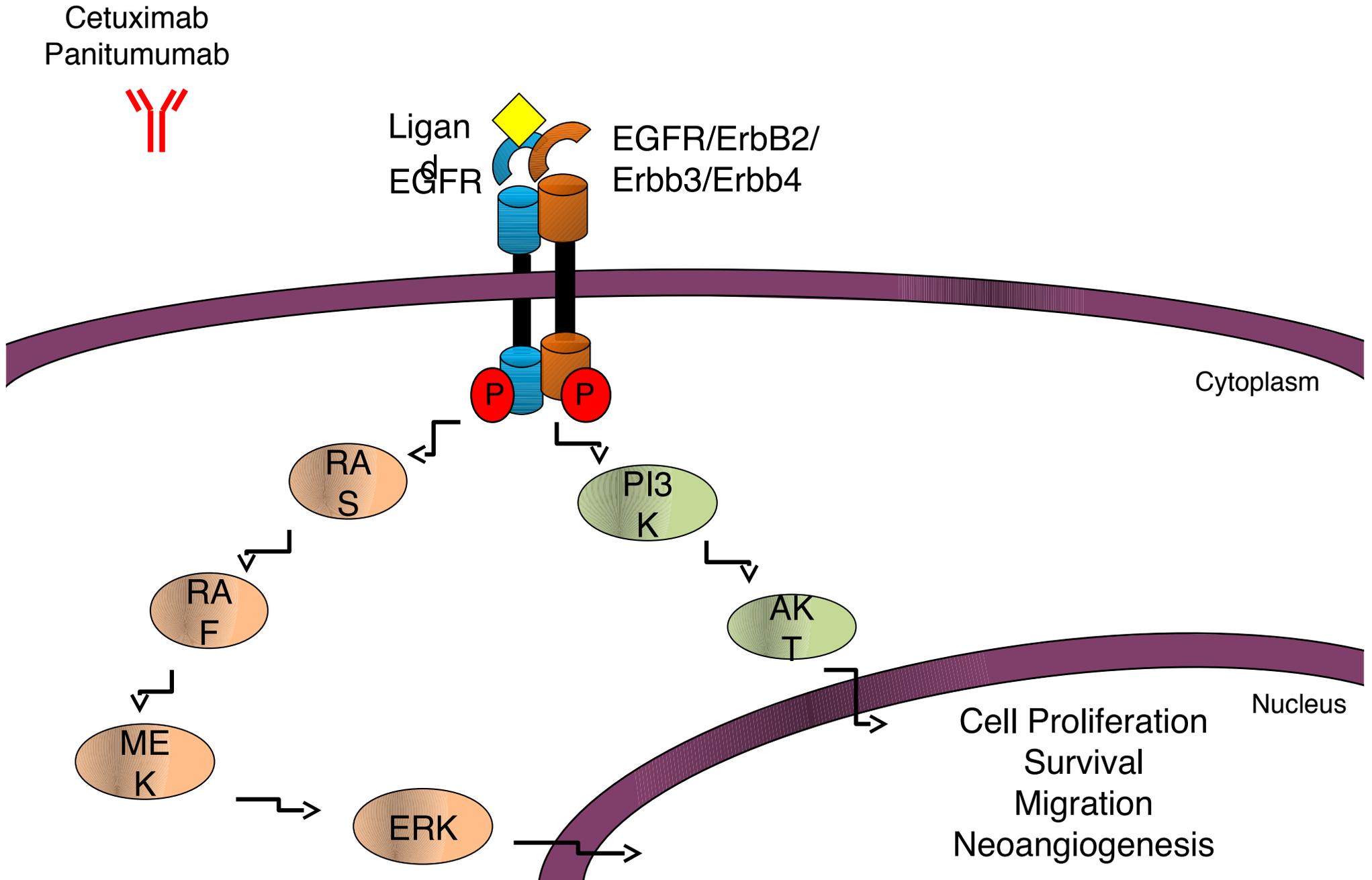
Colorectal Cancer (CRC): development and treatment



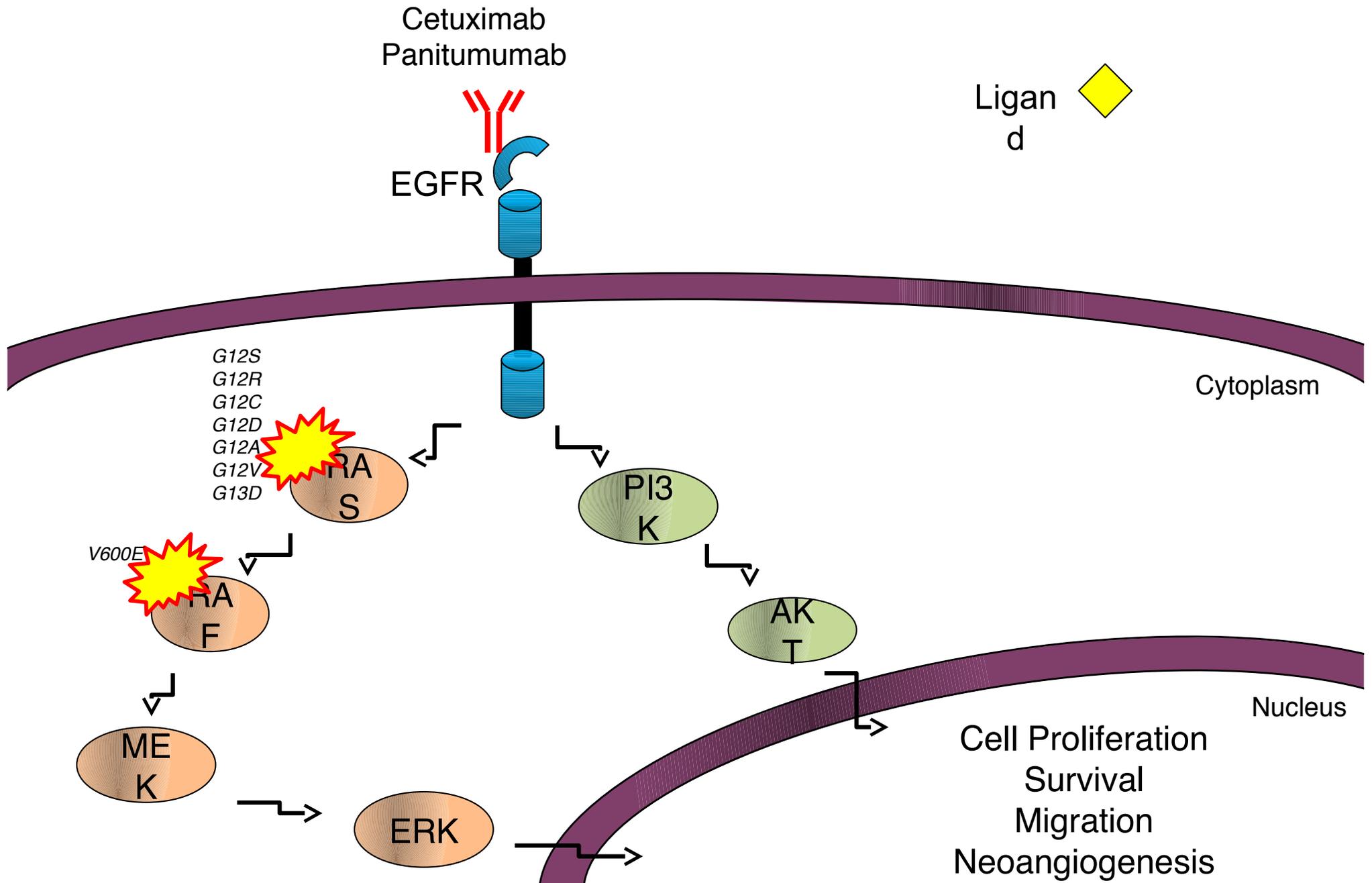
Stage 0	Duke's A (Stage I)	Duke's B (Stage II)	Duke's C (Stage III)	Duke's D (Stage IV)
Polyp removal	Surgery (colectomy)			
				Chemotherapy (FOLFOX, FOLFIRI, XELOX, FOLFOXIRI)
		Radiation		Anti-angiogenic therapy (bevacizumab, regorafenib)
				Anti-EGFR therapy (cetuximab, panitumumab)

Serum biomarker:
Carcinoembryonic Antigen
 (CEA)
 Cut-off <5 ng/mL

Anti-EGFR therapy in colorectal cancer



Primary resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer



Correlation between molecular profiles obtained in tissue and ctDNA

100 patients

200 samples analyzed (plasma samples and matched tissue gDNA)

Screened KRAS, NRAS and BRAF most common mutations (ddPCR and standard sequencing)

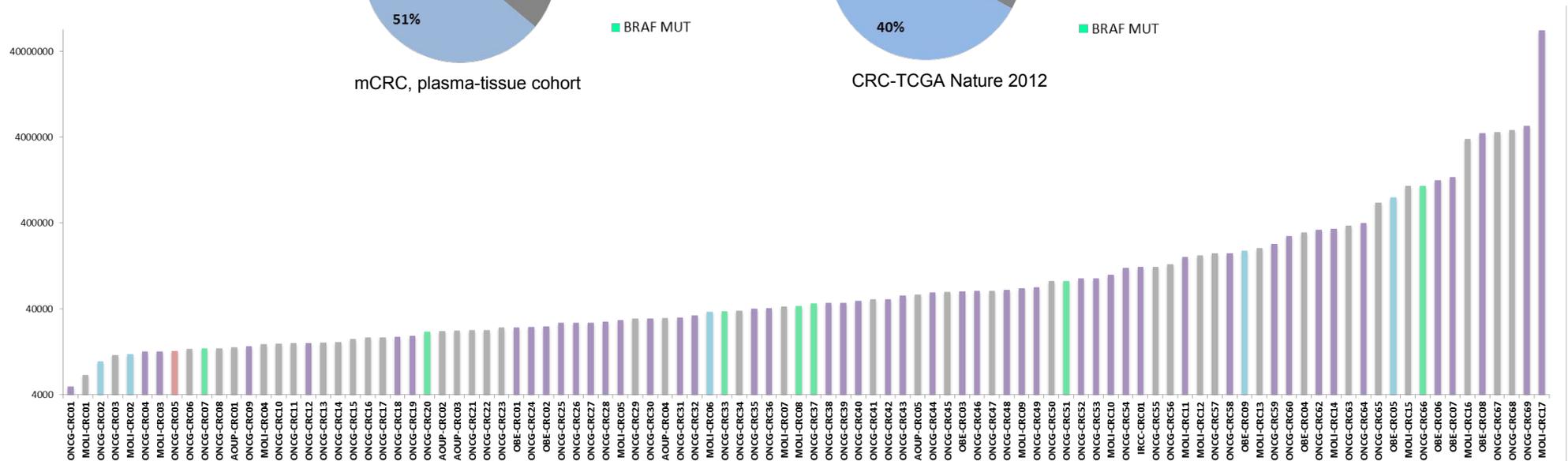
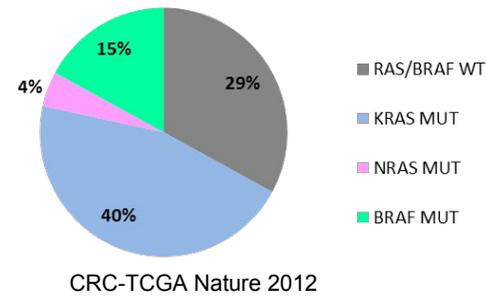
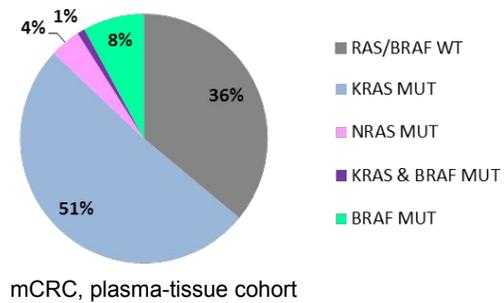
93% of plasma-tissue concordance

8% heterogeneity



plasma-tissue concordant
plasma only
tissue only

Correlation between molecular profiles obtained in tissue and ctDNA

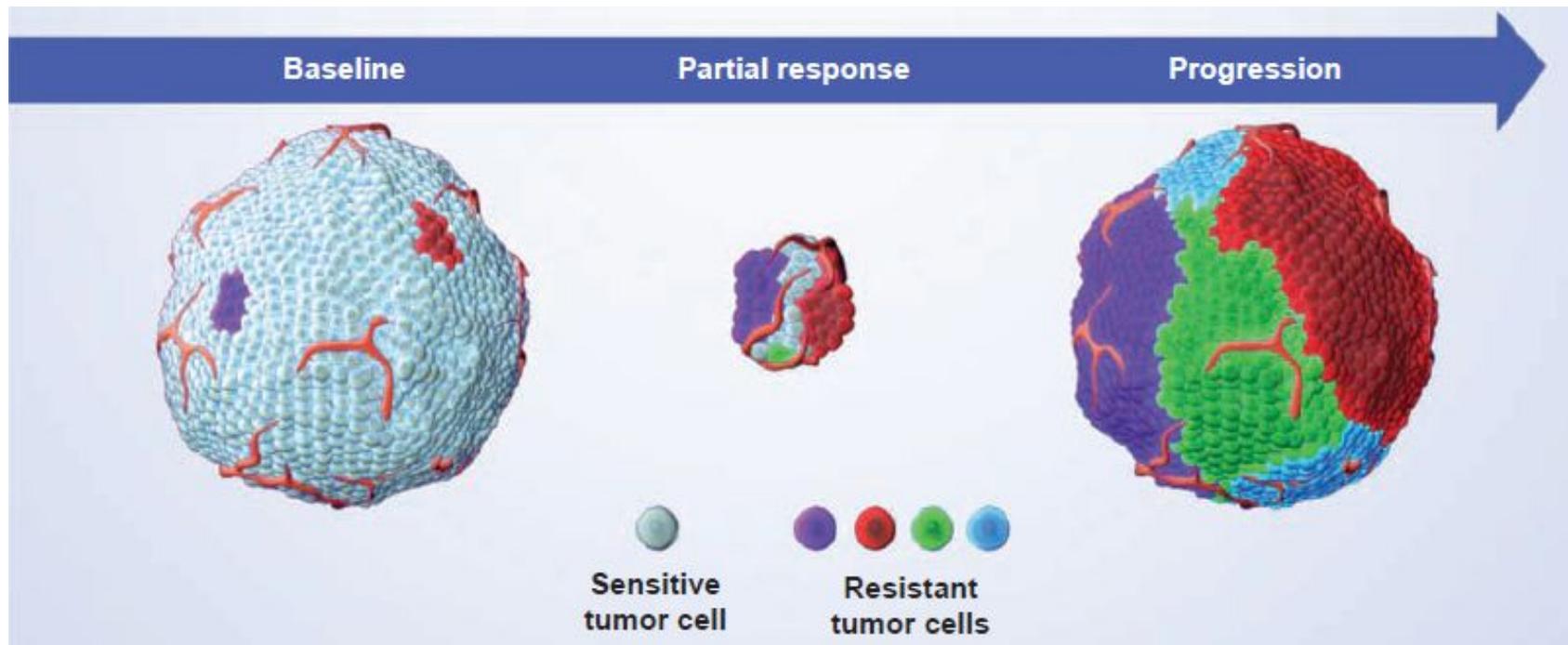


Scientific rationale

Difficulties in accessing tissue samples from resistant colorectal cancer

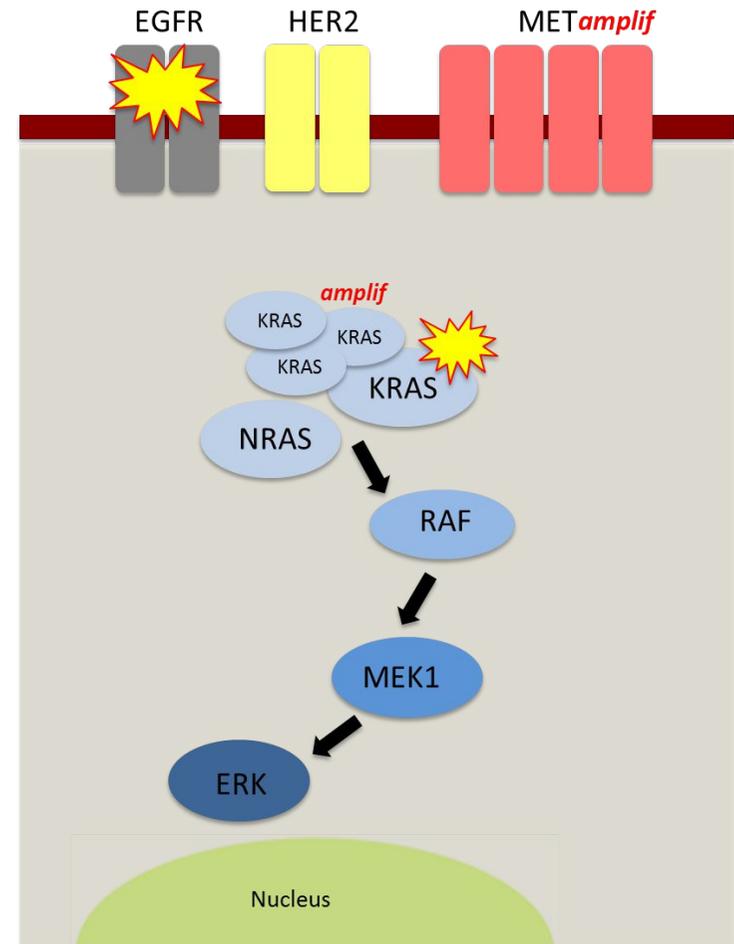
limit our understanding of the heterogeneous molecular bases

of secondary resistance to EGFR blockade.

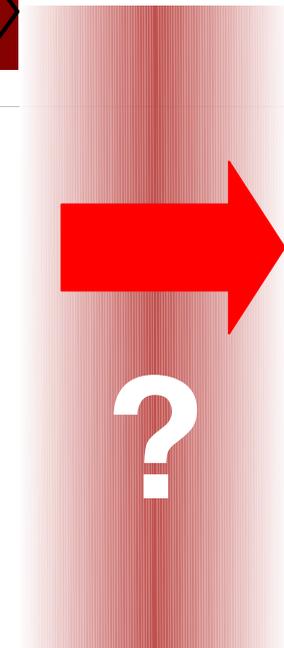
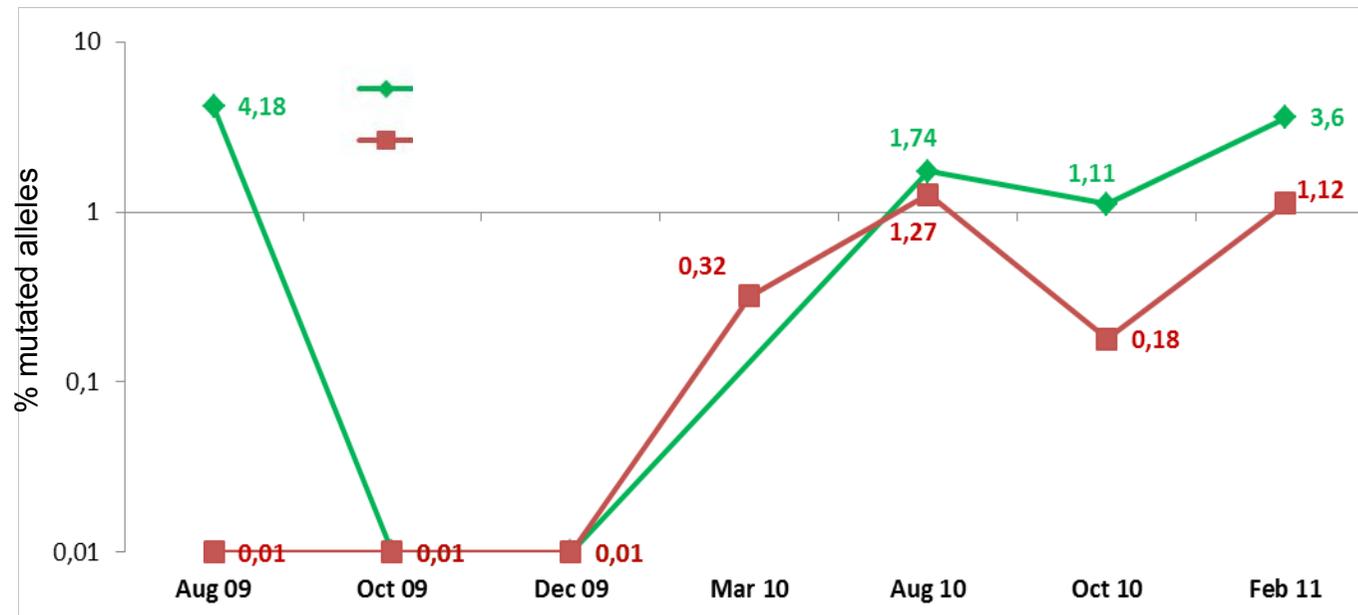
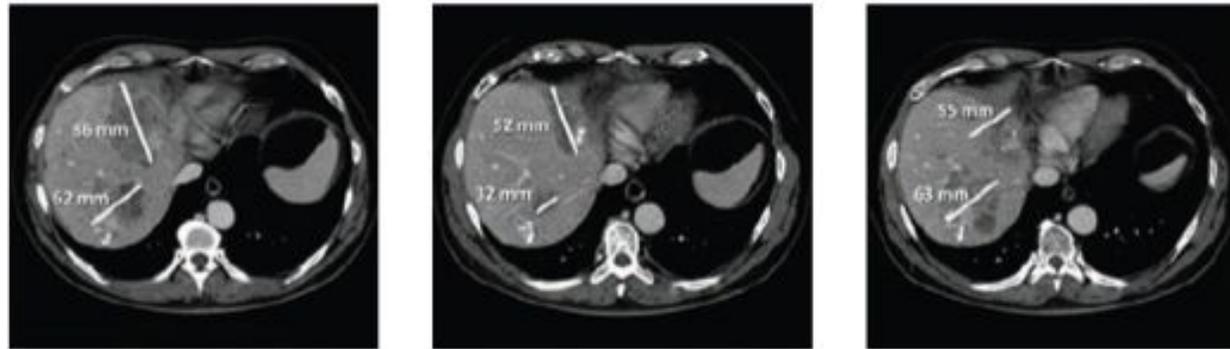


Plasma ctDNA analysis uncovers gene alterations driving acquired resistance in patients receiving anti-EGFR therapies

Patient ID	Therapy	Plasma cfDNA mutation at progression
ONCG-CRC57	Panit	KRAS p.G12A
		KRAS p.G12D
		KRAS p.G13D
AOUP-CRC04	Panit + folfoxiri	KRAS p.Q61H
ONCG-CRC69	Cetux; then panit	KRAS p.G12D
		KRAS p.G13D
MOLI-CRC04	Cetux + folfiri	KRAS p.Q61H
ONCG-CRC67	Panit	MET amplification
AOUP-CRC05	Panit + folfoxiri	KRAS p.G12D
AOUP-CRC01	Cetux + folfoxiri	KRAS p.Q61L
AOUP-CRC06	Cetux + folfoxiri	KRAS p.Q61L
AOUP-CRC03	Panit + folfoxiri	KRAS p.Q61L
ONCG-CRC72	Panit	MET amplification
ONCG-CRC70	Panit + irino	KRAS p.Q61H
		EGFR p.S464L
		EGFR p.G465R
ONCG-CRC71	Panit	KRAS p.Q61H
ONCG-CRC73	Panit	MET amplification
MGH-CRC02	Cetux	KRAS amplification
AOUP-CRC02	Panit + folfoxiri	KRAS p.Q61H
ONCG-CRC72	Panit	EGFR p.G465R
		EGFR p.G465E



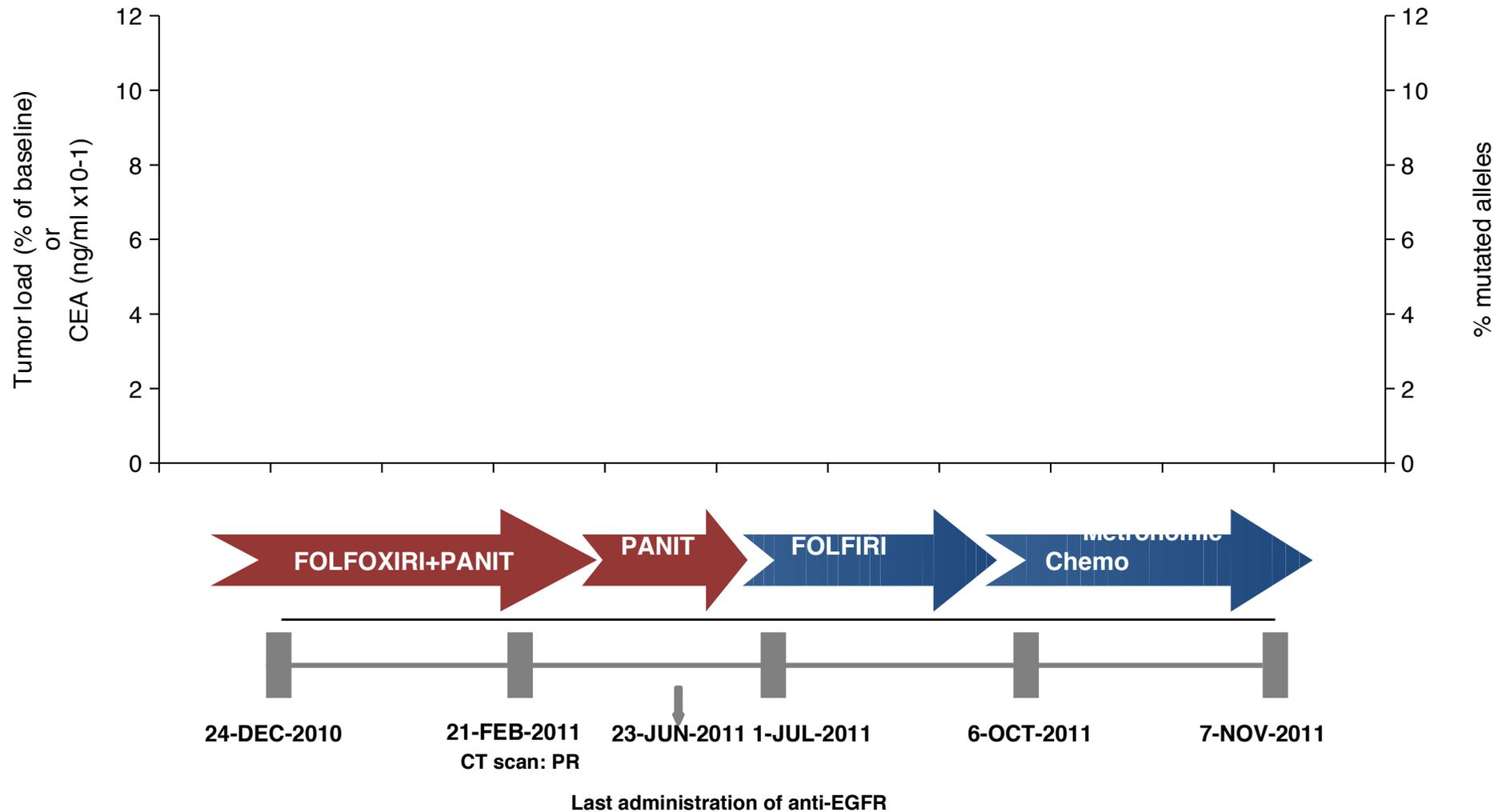
Monitoring clonal evolution and resistance to EGFR blockade in the blood



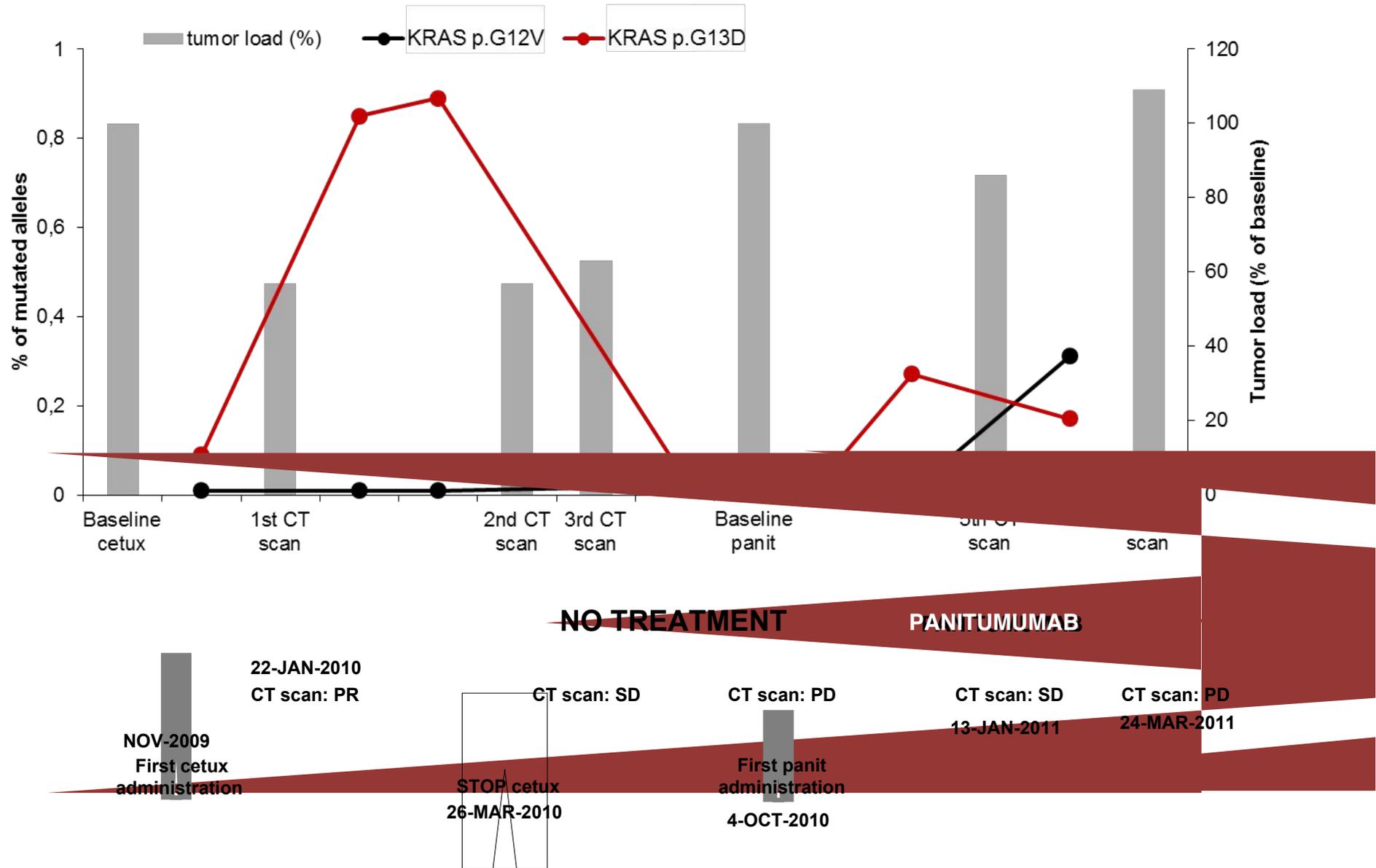
What happens to resistant clones upon progression?

3. Follow tumor clonal evolution with plasma ctDNA:
KRAS clones decline upon withdrawal of EGFR antibodies

AOUP-CRC04

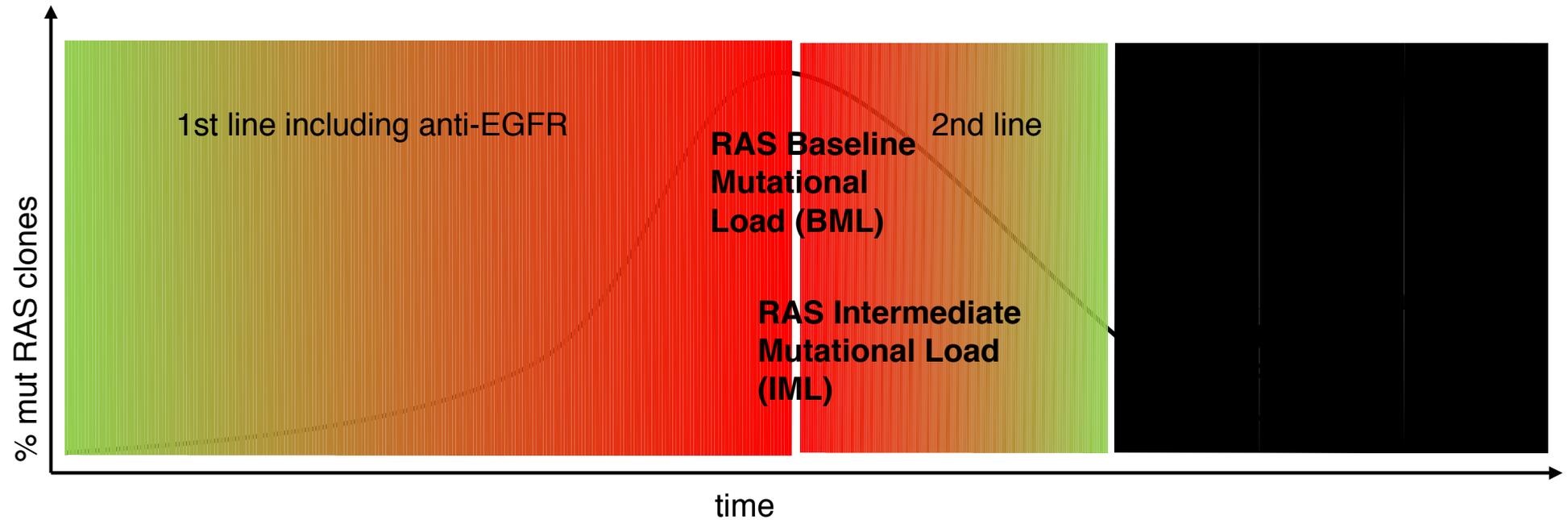


When KRAS clones decline in blood,
 rechallenging with anti-EGFR antibodies can be clinically effective



The CHRONOS trial

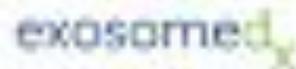
A PHASE II TRIAL OF RECHALLENGE WITH PANITUMUMAB DRIVEN BY
RAS
CLONAL-MEDIATED DYNAMIC OF RESISTANCE



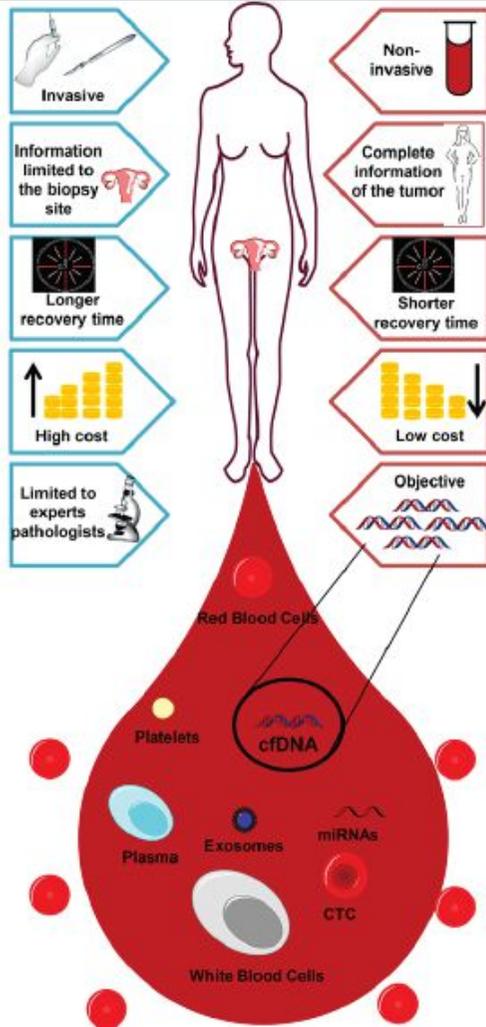
Tumor sensitivity to anti-EGFR



GRAIL



Surgical Biopsy vs. Liquid Biopsy



Pre-Analytical Considerations

A Plasma Collection

Tubes for plasma collection	BD	PAXgene	Streck	NORGEN	Roche
Cost	\$	\$\$	\$\$\$	\$\$\$\$	\$\$\$\$\$
Blood draw volume (mL)	4, 9	10	2, 10	8.3	8.5
Stability	4-6 h at RT or 4 °C	7 days at RT (15-25 °C) or 24 h at 35 °C	14 days at RT (6-37 °C)	30 days at RT (15-25 °C) or 8 days at 37 °C	7 days at RT (18-25 °C) or 16 h at RT (15-30 °C)

RT, room temperature; h, hours

B Plasma procedure



C Extraction and Purification

Kits for extraction and purification	MACHEREY-NAGEL (NucleoSpin Plasma XS)	EPIGENTEK (EpiQuik Circulating Cell-Free DNA Isolation Kit)	Thermo Fisher (MagMAX Cell-Free DNA Isolation Kit)	Qiagen (QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit)	ZYMO RESEARCH (Quick-cfDNA Serum & Plasma Kit)	NORGEN (Plasma/Serum Cell-Free Circulating DNA Purification)
Type of separation						
Cost	\$	\$\$	\$\$\$	\$\$\$\$	\$\$\$\$\$	\$\$\$\$\$
Reactions per kit	10, 250	50	25, 50	50	50	10, 20, 50
Input volume of plasma (mL)	0.2-0.72	0.1-1	0.5-10	1-5	0.2-10	0.010-10
Elution volume (µL)	5-30	20	15-50	20-150	≥50	25-100

Analytical Considerations

D Quantification

>2100 Bioanalyzer DNA Quantification Kit (Agilent)



>NanoDrop 2000 (Thermo Fisher)



>Quant-iT™ Pico Green dsDNA Assay Kit (Thermo Fisher)

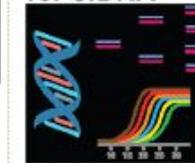
>qPCR

E cfDNA Storage



-20 °C
-80 °C
Liquid N₂

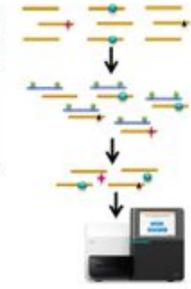
F Detection Technologies for cfDNA



a) PCR



b) Digital PCR (dPCR)



c) NGS

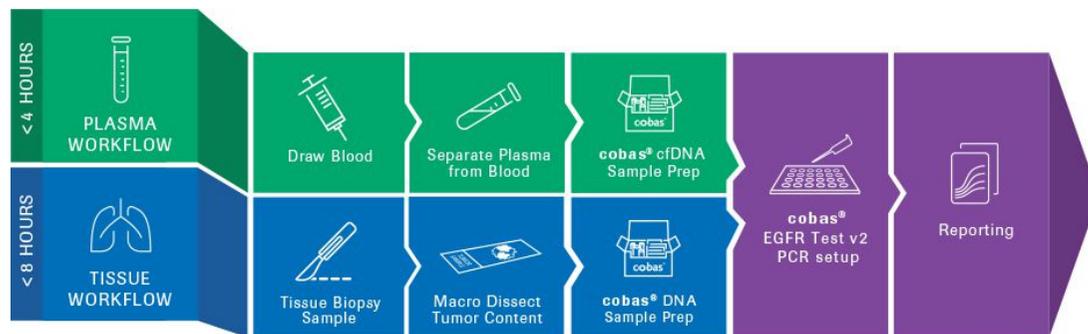
Clinical trials addressing the clinical utility of liquid biopsy in lung cancers

The **EURTAC** trial → ctDNA as a surrogate for EGFR tissue biopsy and its effect on outcomes.

The trial randomized 173 patients with activating EGFR mutations to receive erlotinib or a platinum-based chemotherapy doublet and included analysis of EGFR mutations in serum as a secondary end point.

cobas® test (Roche) to identify plasma EGFR mutations,

Results:



Overall
end point

	cobas® EGFR Mutation Test	BEAMing dPCR
Exon 19 deletion		
Sensitivity	82% (23/28)	82% (23/28)
Specificity	97% (30/31)	97% (30/31)
L858R		
Sensitivity	87% (20/23)	87% (20/23)
Specificity	97% (35/36)	97% (35/36)
T790M		
Sensitivity	73% (30/41)	81% (33/41)
Specificity	67% (16/24)	58% (14/24)

Clinical trials addressing the clinical utility of liquid biopsy in lung cancers

The **LUX3** trial → comparing front line chemotherapy to afatinib (irreversible EGFR TKI)

Therascreen® test (QIAGEN) to identify plasma EGFR mutations

Results:

overall percent agree
showing the presence

discordant samples



cobas® test (Roche)

- 1) identify patients with metastatic non-small cell lung cancer (NSCLC) eligible for treatment with the EGFR-targeted therapeutic erlotinib (Tarceva).
- 2) detects specific alterations in the gene epidermal growth factor receptor (EGFR): exon 19 deletions or exon 21 (L858R) substitution mutations.

This is the first liquid biopsy test approved for use by the FDA.



Therascreen® test (QIAGEN)

In January 2015 EMA granted In Vitro Diagnostic Medical Device (IVD) marking in Europe to the therascreen® EGFR RGQ PCR Kit

Approved by the FDA in 2013



Both IVDs can detect EGFR mutations in blood with accuracy established against bi-directional Sanger sequencing on tumor tissue specimens within the framework of large clinical trials of small molecules EGFR tyrosine kinase inhibitors (TKI) in EGFR mutated patients.

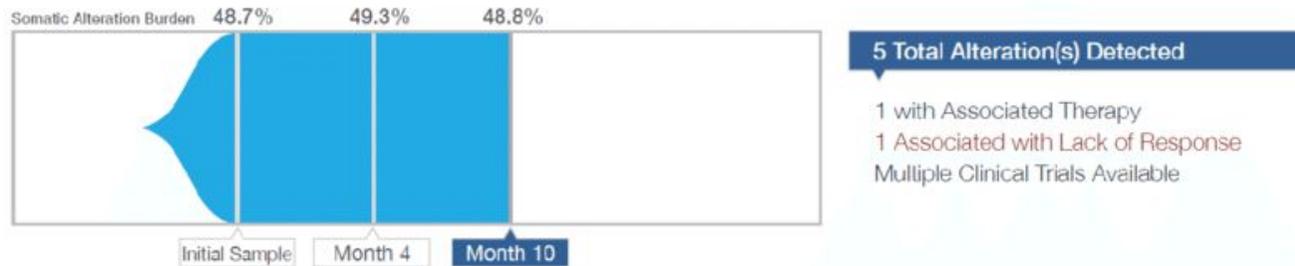


Point Mutations (SNVs) (73 Genes)							Indels (23 Genes)		Amplifications (18 Genes)		Fusions (6 Genes)
AKT1	ALK	APC	AR	ARAF	ARID1A	ATM	ATM	APC	AR	BRAF	ALK
BRAF	BRCA1	BRCA2	CCND1	CCND2	CCNE1	CDH1	ARID1A	BRCA1	CCND1	CCND2	FGFR2
CDK4	CDK6	CDKN2A	CTNNB1	DDR2	EGFR	ERBB2 (HER2)	BRCA2	CDH1	CCNE1	CDK4	FGFR3
ESR1	EZH2	FBXW7	FGFR1	FGFR2	FGFR3	GATA3	CDKN2A	EGFR	CDK6	EGFR	NTRK1
GNA11	GNAQ	GNAS	HNF1A	HRAS	IDH1	IDH2	ERBB2	GATA3	ERBB2	FGFR1	RET
JAK2	JAK3	KIT	KRAS	MAP2K1/MEK1	MAP2K2/MEK2	MAPK1/ERK2	KIT	MET	FGFR2	KIT	ROS1
MARK3/ERK1	MET	MLH1	MPL	MTOR	MYC	NF1	MLH1	MTOR	KRAS	MET	
NFE2L2	NOTCH1	NPM1	NRAS	NTRK1	NTRK3	PDGFRA	NF1	PDGFRA	MYC	PDGFRA	
PIK3CA	PTEN	PTPN11	RAF1	RB1	RET	RHEB	PTEN	RB1	PIK3CA	RAF1	
RHOA	RIT1	ROS1	SMAD4	SMO	STK11	TERT*	SMAD4	STK11			
TP53	TSC1	VHL					TP53	TSC1			
							*includes TERT promoter region	VHL			

Exons selected to maximize detection of known somatic mutations. List available upon request.

Guardant360® Tumor Response Map

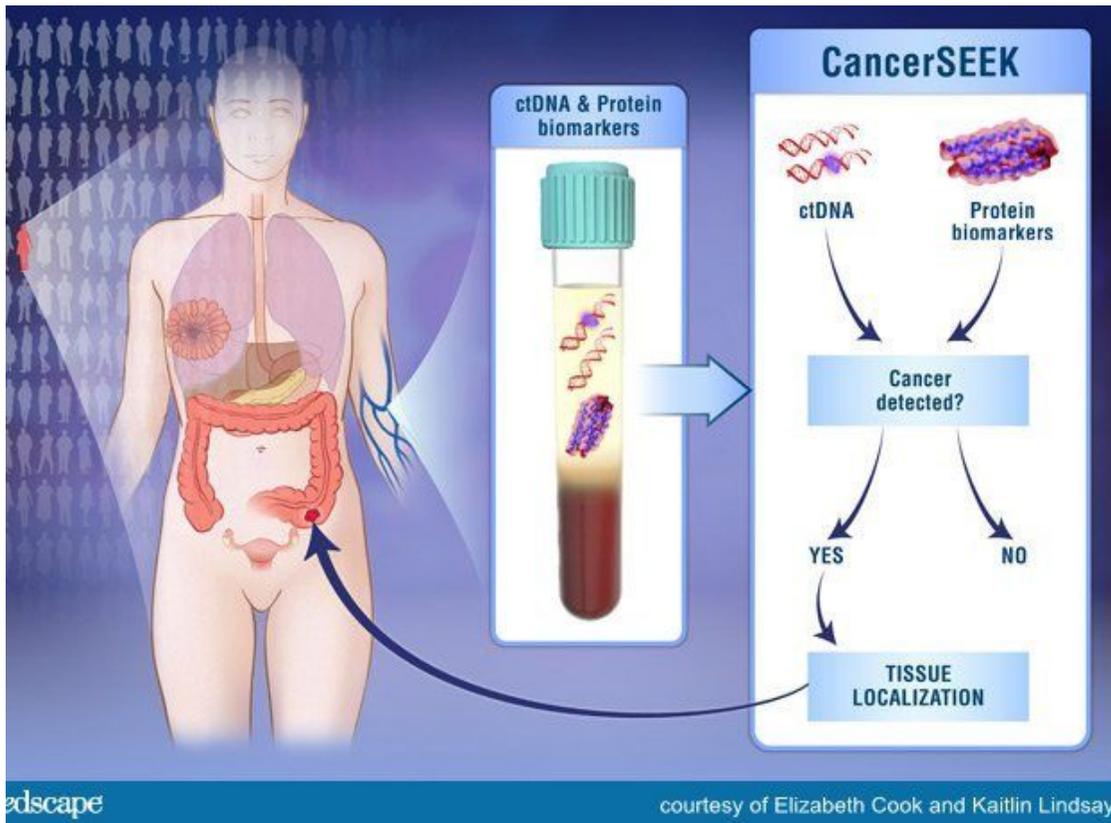
The Guardant360 Tumor Response Map illustrates the relative changes of observed cfDNA at different sample submission time points. The "Somatic Alteration Burden" value below refers to the maximum % cfDNA detected at each time point. Amplifications are not plotted and only the first and last four test dates are plotted. Please see the physician portal for the Tumor Response Map with all test dates.



Summary of Alterations & Associated Treatment Options

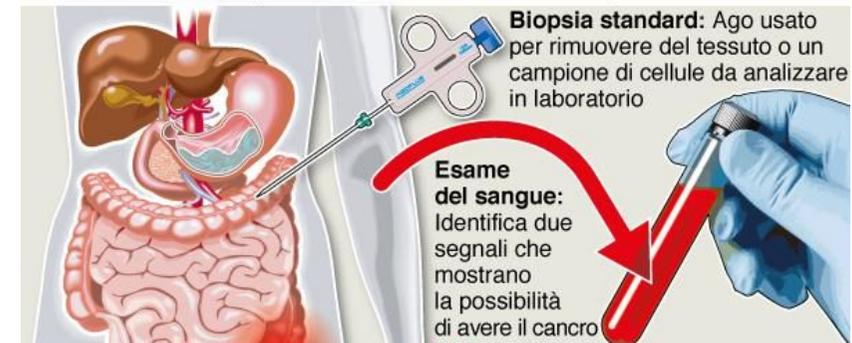
The percentage, or allele frequency, of altered cell-free DNA (% cfDNA) circulating in blood is related to the unique tumor biology of this patient. Factors that may affect the amount/ percentages of detected genomic alterations in circulating cell-free DNA in blood include tumor growth, turn-over, size, heterogeneity, vascularization, disease progression, or treatment.

Alteration	Mutation Trend	% cfDNA	cfDNA Amplification	FDA Approved in Indication	Available for Use in Other Indications	Clinical Drug Trials
EGFR	T790M	48.8		Osimertinib lack of Response: Erlotinib, Gefitinib	Atatinib	Trials Available



IL SISTEMA CANCERSEEK

Una "biopsia liquida" con un esame del sangue permette di identificare 8 diversi tipi di tumore, con risultati molto promettenti

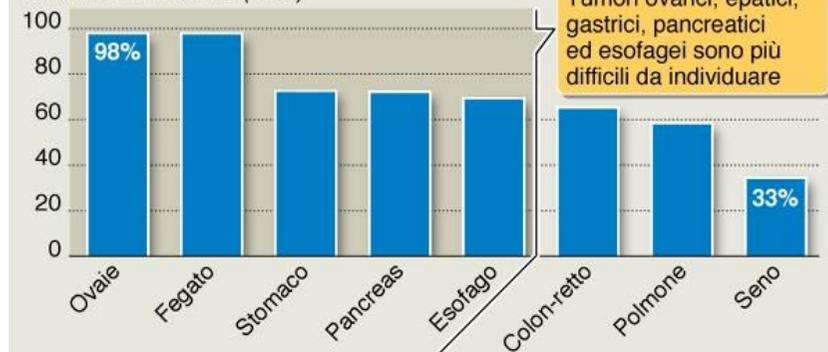


1 Mutazioni genetiche: Più geni vengono compresi nei test, minore è l'affidabilità dei risultati. Mantenendo solo i 16 che tendono a mutare e sono i più comuni nei diversi tipi di cancro

2 Proteine: Vengono aggiunte 8 proteine, già note per essere indicatori affidabili sulla presenza di particolari forme tumorali

3 Risultati: Nei campioni di sangue di 1.005 pazienti con 8 tipi di tumori, il test ha rilevato la presenza tra il 33% e il 98% dei casi

CASI IDENTIFICATI (in %)



$$\text{pg/ul} = \left(\frac{\text{GE/Vex} \cdot (\text{pg/cell})}{(\text{ul elution during isolation} / \text{volume qPCR in ul}) \cdot (1/\text{ml plasma})} \right) / 3$$

$$\text{pg/cell} = 6.6$$

$$\text{ul elution during isolation} = 140$$

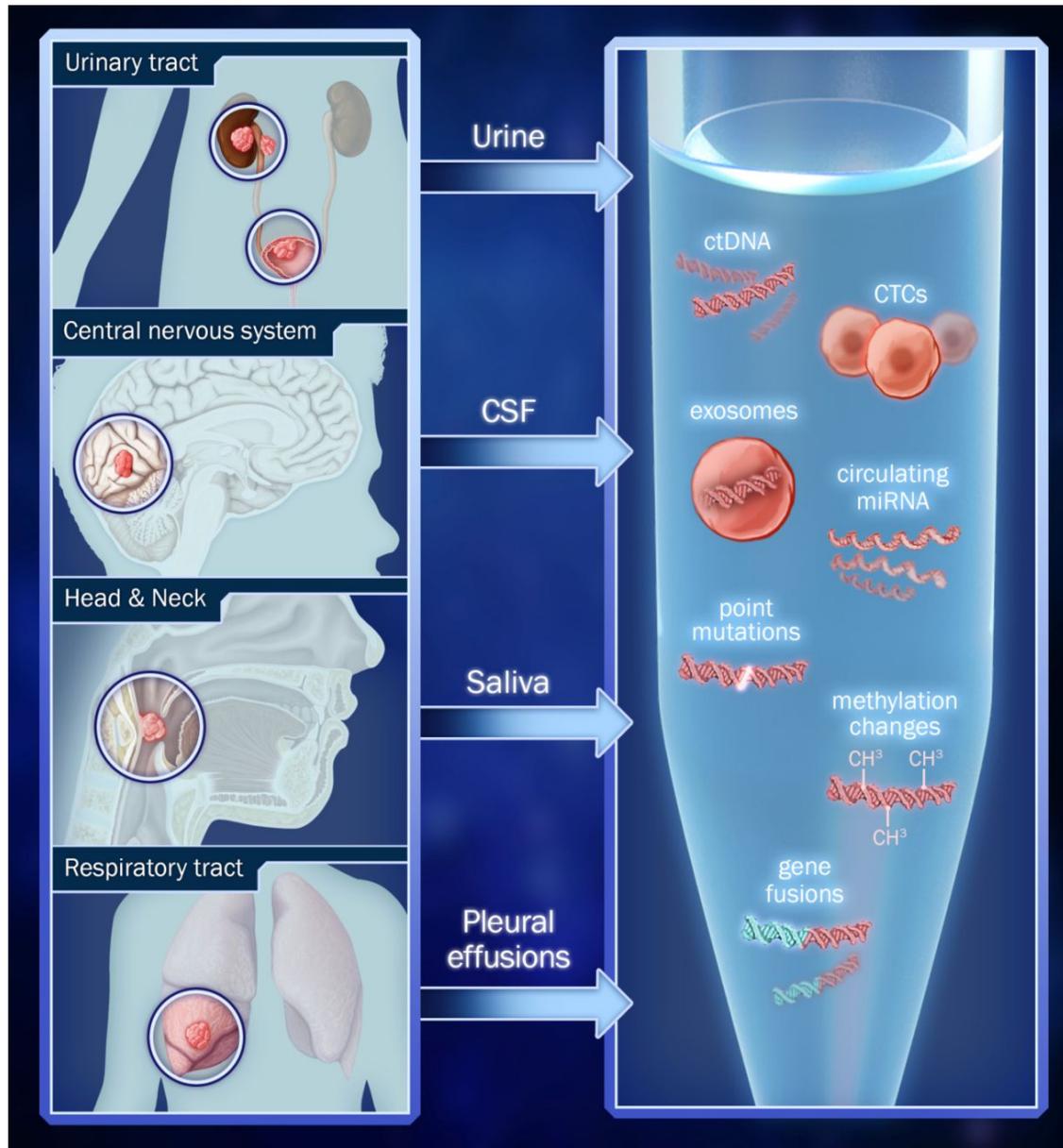
$$\text{volume qPCR in ul} = 3$$

$$\text{ml plasma} = 1$$

$$\text{pg/ul} = (\text{GE/ml plasma} \cdot 6.6) / 140$$

$$\text{es. } (20000 \cdot 6.6) / 140 = 943 \text{ pg/ul ovvero } 0.943 \text{ ng/ul}$$

- There is more than blood....





**Analisi mutazionale di EGFR su plasma nelle
neoplasie polmonari, un modello di
integrazione tra l'Oncologo, il Patologo e il
Biologo Molecolare**

8 Ottobre 2018
Lucio Buffoni & Luisella Righi



L'esperienza dell'Ospedale San Luigi

La voce dell'oncologo

Dr. Lucio Buffoni
SSD Oncologia Polmonare
AOU San Luigi Gonzaga, Orbassano

COSA "VORREBBE" L'ONCOLOGO POLMONARE DA A.P./B.M.?

- ▶ FARE BIOPSIA LIQUIDA TUTTE LE VOLTE CHE VOGLIO/RITENGO UTILE ->
 - TESTARE MUT ANCHE SENZA BIOPSIA TEX
 - CAMBIARE TERAPIA APPENA SIA NECESSARIO E **NON** "PERDERE" IL PAZIENTE.
- ▶ AVERE RISPOSTE "AFFIDABILI" E CHIARE (REFERTO)
- ▶ AVERE RISPOSTE RAPIDE
- ▶ ESSERE POCO INVASIVO
- ▶ SPENDERE POCO

INDICAZIONI BIOPSIA LIQUIDA:

1. NSCLC AVANZATO NAIVE:

- ▶ 25% BIOPSIE SOLIDE SCARSA QUALITA' / QUANTITA'
- ▶ TOT % NO POSSIBILE FARE DIAGNOSI (LESIONI PICCOLE, SEDI NON RAGGIUNGIBILI, COMORBIDITA' PAZIENTE)



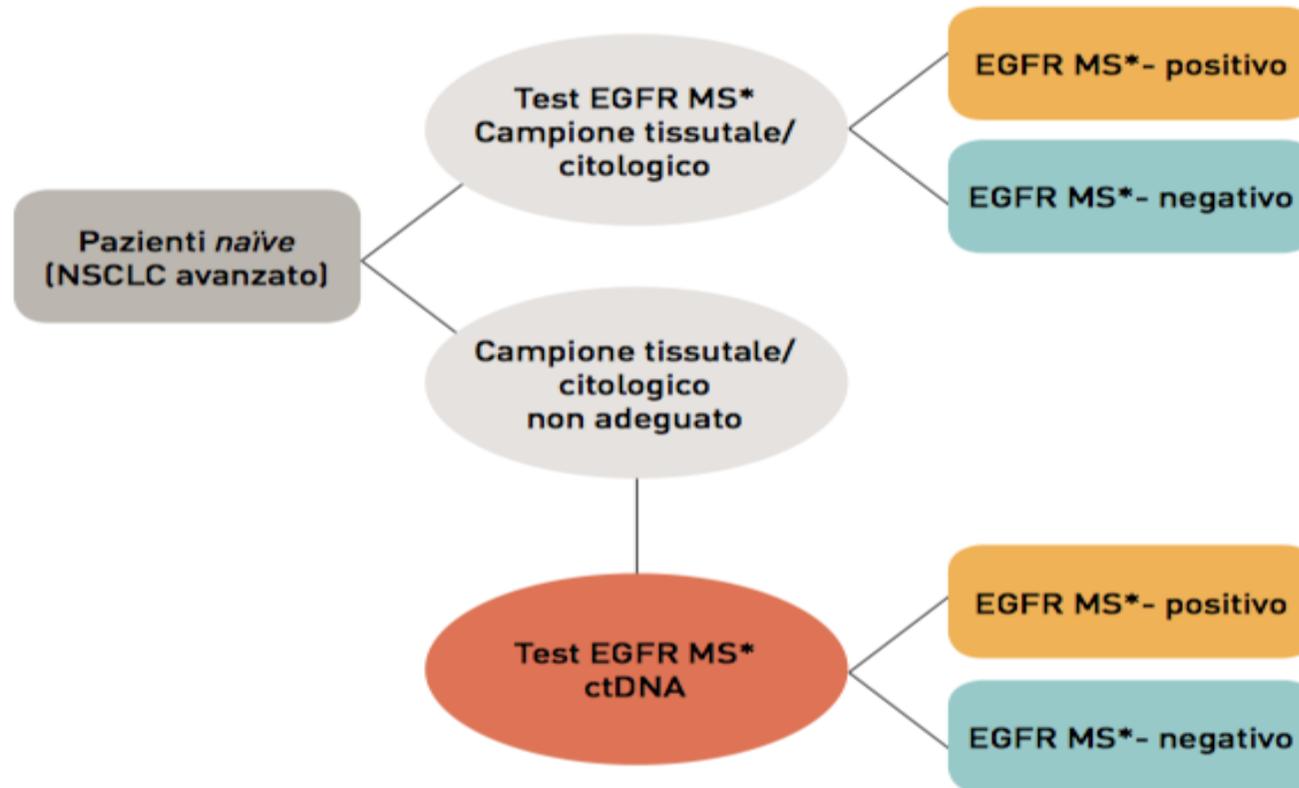
QUANTITA'-QUALITA' TESSUTO NON SONO ADEGUATE X MOLECOLARI

2. NSCLC AVANZATO IN TRATTAMENTO CON TKIs :

- ▶ OSIMERTINIB X T790M (AURA PFS = TRA SOLIDA E LIQUIDA)
- ▶ SEDE MTS NON RAGGIUNGIBILE O NON AFFIDABILE-> ENCEFALO - OSSA

RACCOMANDAZIONI PER L'ESECUZIONE DI TEST MOLECOLARI SU **BIOPSIA LIQUIDA** IN ONCOLOGIA

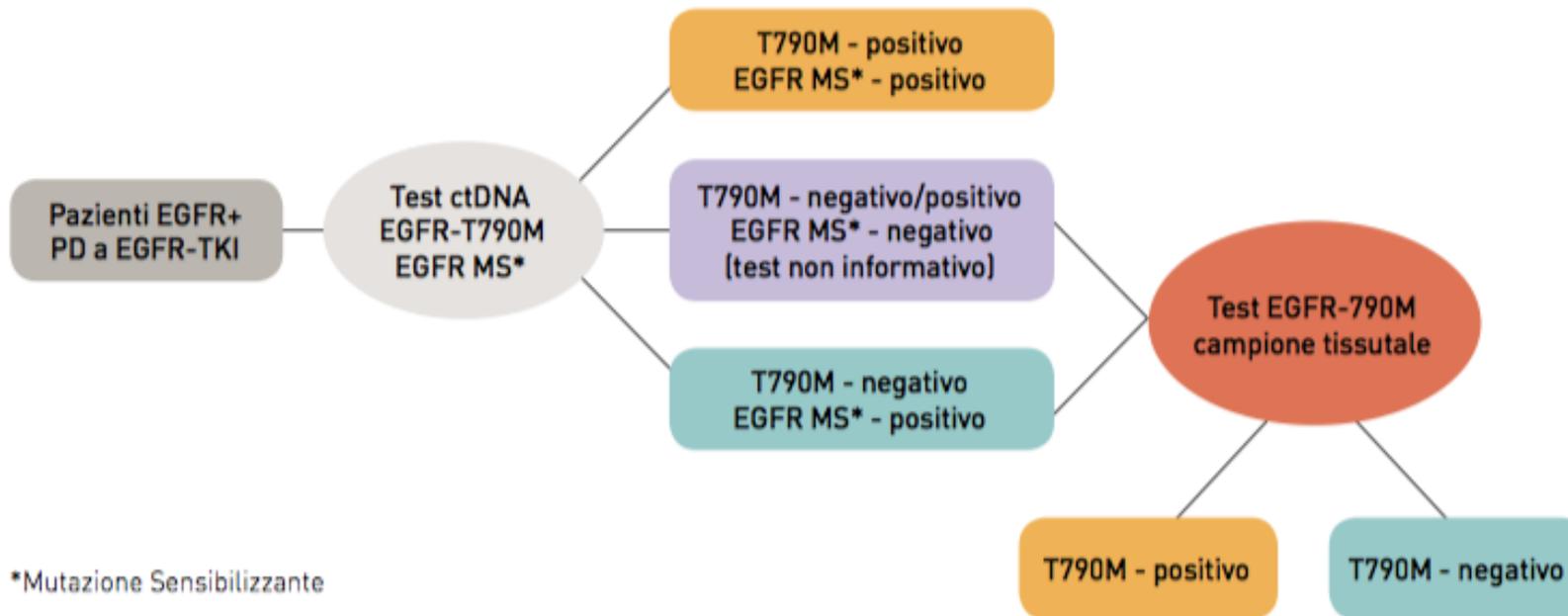
LUGLIO 2018



*Mutazione Sensibilizzante

RACCOMANDAZIONI PER L'ESECUZIONE DI TEST MOLECOLARI SU **BIOPSIA LIQUIDA** IN ONCOLOGIA

LUGLIO 2018



AVERE RISPOSTE “AFFIDABILI” PER GUIDARE LE MIE SCELTE

- ▶ I INDICAZIONE (*naive*)
SPECIFICITA' 90% SENSIBILITA' 50-80% (DIVERSA TECNOLOGIA -> RT-PCR, D-PCR, NGS)

- ▶ II INDICAZIONE (*treated*)
 - SENSIBILITA' /SPECIFICITA' PER T790M < RISPETTO MUT ATTIVANTI EGFR
 - **SEDE PD**-> INTRATORACICA/EXTRATORACICA (SENSIBILITA' 50-80%)
 - **ENTITA' PD**
 - CONCOMITANTE RICERCA MUT ATTIVANTE, SE QUESTA NEGATIVA VEDI TABELLA.

AVERE RISPOSTE “AFFIDABILI” PER GUIDARE LE MIE SCELTE

TABELLA 1. NSCLC avanzato: interpretazione del risultato del test EGFR su biopsia liquida in pazienti in progressione dopo EGFR TKI

Mutazione EGFR sensibilizzante	T790M	Interpretazione
+	+	T790M positivo
+	-	T790M negativo. La biopsia tessutale è raccomandata.
-	+	T790M positivo. L'analisi deve essere ripetuta per escludere possibili falsi positivi.
-	-	Campione non informativo. I livelli di ctDNA sono troppo bassi. Ripetere prelievo o procedere alla biopsia tessutale.

VANTAGGI:

- ▶ FACILE DA ESEGUIRE PER OPERATORE E PAZIENTE MA...ATTENZIONE! (FASE PREANALITICA!)
- ▶ MENO COSTOSO DI BIOPSIA SOLIDA E MENO RISCHIOSO (PNX 5%) PIU' RAPIDO DA ORGANIZZARE
- ▶ TEMPI PIU' RAPIDI PER ESITO (5-7 GIORNI?)
- ▶ RIFLETTE CON PIU' "ATTENDIBILITA'" LA ETEROGENEITA' DEL TUMORE (ETEROGENEITA' SPAZIALE E TEMPORALE) -> PRIMITIVO, DIVERSE SEDI MTS, LUNGO LA STORIA DEL PAZIENTE.
- ▶ PUO' ANTICIPARE LA PD CLINICA (ma ci serve?)

SVANTAGGI:

- ▶ FACILE DA ESEGUIRE PER OPERATORE E PAZIENTE MA...ATTENZIONE!(FASE PREANALITICA!)
- ▶ MENO COSTOSO DI BIOPSIA SOLIDA E MENO RISCHIOSO (PNX 5%)
PIU' RAPIDO DA ORGANIZZARE -> MA SE LA FACCIO AL MOMENTO SBAGLIATO AGGIUNGO COSTI
MONETARI E PSICHICI INUTILI
- ▶ TEMPI PIU' RAPIDI PER ESITO (5-7 GIORNI?) -> SONO UGUALI!
- ▶ RIFLETTE CON PIU' "ATTENDIBILITA'" LA ETEROGENEITA' DEL TUMORE (ETEROGENEITA' SPAZIALE E TEMPORALE) -> PRIMITIVO, DIVERSE SEDI MTS, LUNGO LA STORIA DEL PAZIENTE.
- ▶ PUO' ANTICIPARE LA PD CLINICA (ma ci serve?)

L'esperienza dell'Ospedale San Luigi

La voce del patologo

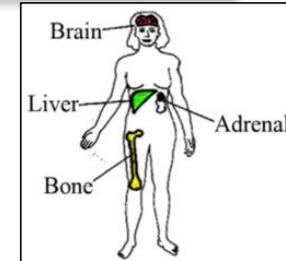
Luisella Righi

luisella.righi@unito.it

***University of Torino - Pathology Unit
San Luigi Hospital- Orbassano (TO)- Italy***

Cosa si aspetta l'oncologo dal patologo

Malattia avanzata
Tessuto piccolo bioptico



Diagnosi precisa e dettagliata

- ***Lesione benigna/maligna***
 - ***Primitivo/metastasi***
- **Tipizzazione del NSCLC NAS**
- **Determinazione marcatori predittivi (IHC, MB)**
 - **Monitorare l'evoluzione su biopsia liquida**

ESPERIENZA SAN LUIGI (Gen 16-Giu 18)

N. Liquide	146
N. Pazienti EGFR+	110
Bio multiple (2/3)	25

Mutazioni attivanti

WT	55/110	(50%)
Ex 18	2	(2%)
Ex 19	0	(0%)
Del 19	36	(32%)
Del 20	0	(0%)
Ex 21	16	(15%)
Ex 20ins	1	(1%)

T790M

NEG	86/110	(78%)
POS	24/110	(22%)

BIO TESSUTO	46/86	(54%)
-------------	-------	-------

NO BIO TESSUTO	40/86	(46%)
----------------	-------	-------

Mutazioni attivanti

WT	3/46	(7%)
Ex 18	4	(9%)
Ex 19	1	(2%)
Del 19	23	(50%)
Del 20	1	(2%)
Ex 21	14	(30%)

T790M

NEG	24/46	(52%)
POS	22/46	(48%)

TOT T790M POS	24+22/110	(42%)
----------------------	------------------	--------------

Mutazioni attivanti EGFR

BIO TESSUTO

		BIO TESSUTO		46
		WT	MUT	
BIO LIQUIDA	WT	2*	24	26
	MUT	1**	19	20
		3	43	46

*1 Caso ALK+ 1 caso KRAS+

** bio istologica NV

EGFR T790M

BIO TESSUTO

		BIO TESSUTO		26
		NEG	POS	
BIO LIQUIDA	NEG	14	12	26
	§POS	2	6	8

§ casi di validazione

Confronto tra analisi di biopsie liquide (BL) ripetute e tessuto (post-plasma)
per la ricerca della mutazione EGFR T790M

PAZIENTI	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
Mut attivante*	Red	Light	Red	Red	Light	Red	Light	Light	Light	Red	Light	Light	Blue	Light	Light	Light	Blue	Light	Red	Light	Red	Red	Blue	Light	Light
BL 1 (T790M)	Light	Light	Red	Light																					
BL 2 (T790M)	Light	Light	Red	Red	Light	Light	Light	Light	Light	Red	Light	Light	Red	Light	Red	Light	Light	Light							
BL 3 (T790M)	Light	Grey	Red	Grey	Light	Grey	Grey	Grey	Light	Grey	Grey	Grey	Light	Grey	Grey										
Tessuto (T790M)	Light	Red	Light	Grey	Red	Light	Light	Light	Grey	Grey	Light	Grey	Grey	Grey	Red	Red	Light	Red	Light	Red	Light	Light	Red	Light	Red

* La mutazione attivante è risultata sempre positiva sul tessuto



8/25 (32%) casi sono risultati positivi per T790M sul tessuto ma non sulla bio liquida

Utilizzo dei tubi stabilizzatori per la conservazione della biopsia liquida di pazienti oncologici da sottoporre ad analisi mutazionale

Claudia Veggiani

Laboratorio di Patologia Molecolare - Anatomia Patologica AOU Maggiore della Carità di Novara

Il Gruppo di Lavoro di Patologia Molecolare (GdL) ha discusso l'opportunità di favorire la caratterizzazione molecolare a scopo predittivo di neoplasie polmonari su biopsia liquida anche per i pazienti che afferiscono in Aziende Ospedaliere che non dispongono del laboratorio in grado di effettuare tale esame. Essendo nota la necessità di evitare l'emolisi e il rilascio di DNA libero circolante da parte dei globuli bianchi in apoptosi, che diluirebbe la percentuale di DNA TUMORALE libero circolante rispetto al DNA libero circolante totale, è indispensabile sierare il sangue entro le prime due ore dal prelievo. Resta evidente che in alcune situazioni diventa **impossibile** eseguire correttamente il test.

E' stato perciò chiesto ausilio alla Rete Oncologica a coprire le spese per acquistare provette di raccolta di sangue contenente uno stabilizzatore del DNA libero circolante che rende possibile la conservazione del campione fino a 72 ore dal momento del prelievo e quindi consente anche a pazienti in carico ad Oncologie esterne di beneficiare dell'esame.

La Rete Oncologica, valutato il progetto presentato, ha deciso di supportare l'acquisto di un centinaio di tubi stabilizzatori forniti in esclusiva dalla Ditta Diatech Pharmacogenetics da suddividere tra gli 8 laboratori che costituiscono il GdL e che eseguono regolarmente l'attività di Patologia Molecolare in Piemonte e Valle d'Aosta e precisamente:

AOU Maggiore della Carità di Novara

Città della Salute e della Scienza di Torino

Osp. Maria Vittoria – G. Bosco di Torino

Osp. San Luigi di Orbassano

IRCCS di Candiolo

Osp. di Cuneo

Osp. di Alessandria

Osp. di Aosta

I tubi stabilizzatori sono arrivati a marzo 2018 e consegnati dall'Azienda capofila ad aprile ai laboratori sopra citati e agli effettivi utilizzatori (Ospedali di quadrante).

Per quanto riguarda la nostra Azienda, con l'utilizzo dei tubi stabilizzatori abbiamo notato un incremento delle biopsie liquide che giungono dagli Ospedali esterni, nel dettaglio: in assenza di tubi stabilizzatori nel 2016 sono pervenute sei biopsie liquide, mentre nel 2017 otto. Di questi 14 casi 4 sono giunte al limite od oltre le 3h di conservazione del cfDNA ed altrettante 4 senza l'orario di prelievo, 1 addirittura congelata. Nel

2018, con la possibilità di utilizzo dei tubi stabilizzatori, sono pervenute 14 biopsie liquide dai centri esterni, di cui 7 mediante l'utilizzo dei tubi stabilizzatori. Nello specifico: in 1 caso è stata identificata mutazione attivante e in 1 sia la mutazione attivante che la mutazione di resistenza T790M.

Il dato è promettente come possibilità di fornire l'analisi mutazionale su biopsia liquida a tutti i pazienti oncologici che la necessitino anche se seguiti in oncologie geograficamente decentrate rispetto ai laboratori che svolgono la diagnostica molecolare. Sicuramente la delicatezza dell'analisi pone la preparazione del plasma come primo punto di appropriatezza del test e oggi siamo concordi nel dichiarare che solo il riscontro di almeno una mutazione (quella attivante) rende informativo il campione. Un obiettivo del GdL di Patologia Molecolare è la qualità certificata delle analisi che effettuiamo e l'uso dei tubi stabilizzatori ci consentirà di portare avanti esclusivamente esami su biopsia liquida in condizione controllata di preparazione/conservazione.