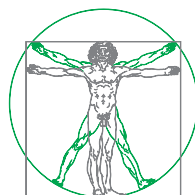




ONCOREVOLUTION

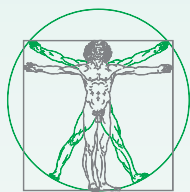
Liquid BIOPSY Revolution Oncology Diagnostics

Relazione Tecnica



AMES
Group

GENETICA MEDICA • MICROBIOLOGIA • PATOLOGIA CLINICA



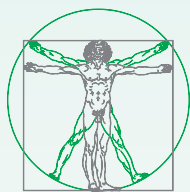
ONCOREVOLUTION LIQUID BIOPSY®

Negli ultimi decenni si è registrato in Italia un costante incremento della prevalenza di pazienti con storia di cancro ed ogni giorno circa 1000 persone ricevono la diagnosi di tumore. I tumori rappresentano infatti la seconda causa di morte, circa il 30% di tutti i decessi, dopo le malattie cardio-circolatorie. Tali numeri testimoniano la rilevanza della patologia oncologica e gli sforzi che devono essere fatti in termini di prevenzione primaria per ridurre il rischio di ammalarsi. La lotta al cancro richiede sempre di più lo sviluppo e la definizione di un approccio multidisciplinare che coinvolga tutti i settori della ricerca biomedica oncologica con trasferimenti delle scoperte, sempre più tempestivi, nei settori della diagnosi, della cura e della prevenzione dei tumori. Il processo di trasformazione neoplastica avviene attraverso varie tappe con progressivo accumulo di anomalie genetiche, funzionali e morfologiche. Si tratta di un processo lento e progressivo che, nella maggioranza dei casi, è contrastato con successo dai meccanismi di riparazione dell'organismo e dal sistema immunitario. Quando però questi meccanismi di controllo falliscono, la carcinogenesi prosegue nelle sue tappe e alla fase iniziale segue una fase di progressione, in cui le cellule anomale sono in grado di moltiplicarsi e di migrare verso organi a distanza (disseminazione, metastasi) fino a minacciare la vita dell'intero organismo. Tanto maggiori saranno le anomalie genetiche accumulate, tanto più la cellula neoplastica, priva di controllo proliferativo, diverrà invasiva a scapito dei tessuti dell'organismo. Attualmente il metodo "gold standard" per la diagnosi di cancro è rappresentato dalla biopsia tissutale, generalmente del tumore primario, che permette di ottenere la caratterizzazione del profilo mutazionale del tumore, al fine di stabilire la strategia terapeutica più indicata. Tuttavia la biopsia tissutale presenta diversi limiti: oltre infatti a costituire un rischio per il paziente, rappresenta una procedura invasiva, dolorosa nonché costosa e che non è sempre realizzabile, a causa di un difficile accesso alla sede tumorale. Inoltre, la biopsia tumorale non sempre fornisce informazioni adeguate per prevedere la progressione e la prognosi.

La biopsia liquida rappresenta l'inizio di una nuova era nella diagnosi, la prevenzione, il trattamento e follow-up delle patologie tumorali. Questa metodica si basa sulla possibilità di isolare dal sangue il DNA tumorale circolante (ctDNA) e ottenerne la genotipizzazione mediante il sequenziamento massivo, superando così le problematiche connesse alla localizzazione tumorale e/o alla esiguità del campione dei prelievi in biopsia solida.

Il DNA tumorale circolante (ctDNA)

Il DNA libero circolante (cfDNA) è un DNA rilasciato dalle cellule dell'organismo nel torrente circolatorio, durante i normali processi di apoptosi (morte cellulare programmata). Esso può essere rilevato sia nel plasma che in altri liquidi biologici, quali urine, liquido cerebro spinale (CSF), liquido pleurico, ecc. L'emivita del cfDNA è estremamente breve, tuttavia il rapido turnover di questo DNA può essere utile per tracciare in tempo reale i cambiamenti genomici e genetici. Così come le cellule di un tessuto sano rilasciano cfDNA, anche le cellule tumorali sono in grado di rilasciare nel torrente circolatorio del DNA tumorale (ctDNA). Diversi studi scientifici hanno dimostrato che la quantità di ctDNA correla con le dimensioni e lo stadio del tumore; infatti tumori in fase avanzata (IV stadio) presentano circa 100-10000 copie di ctDNA in 5 mL di plasma rispetto alle circa 10 copie riscontrate nei tumori in uno stadio precoce.



Utilità Clinica dell'analisi del DNA tumorale circolante (ctDNA)

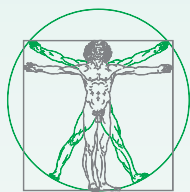
L'analisi del ctDNA presenta numerosi vantaggi. Infatti è raccomandato in tutti i casi in cui non è possibile effettuare la biopsia o ripetere la stessa. Tramite l'analisi del ctDNA è possibile ottenere alcune informazioni di estrema importanza, quali l'eterogeneità genetica del tumore e la caratterizzazione del profilo mutazionale del tumore primario e dei siti di metastasi, per stabilire sia il trattamento terapeutico appropriato, sia la prognosi e la stadiazione. Altro vantaggio dell'analisi del ctDNA è la possibilità di poter monitorare nel tempo lo stadio della malattia. La presenza di ctDNA è esso stesso indice di malattia, per cui può essere utilizzato per seguire la malattia minima residua, rappresentando un ottimo parametro per il follow-up. Alla luce di queste osservazioni, bassi livelli di ctDNA indicano una buona risposta ai trattamenti terapeutici, mentre un aumento dei livelli di ctDNA nel tempo è indice di ricadute, progressione e sviluppo di resistenza ai farmaci. Numerosi studi hanno dimostrato che mutazioni in specifici geni sono associate a meccanismi di resistenza a determinati trattamenti farmacologici. Ad es. pazienti affetti da tumore polmonare non a piccole cellule (NSCLC) trattati con inibitori dell' EGFR, che presentano mutazioni nel gene KRAS, sono resistenti alla terapia con tali farmaci. **La possibilità di poter rilevare mutazioni specifiche del tumore fornisce informazioni utili per stabilire l'evoluzione del tumore nel tempo e permette una precoce diagnosi, prima ancora che ve ne sia una chiara evidenza clinica.**

Biopsia Liquida

Lo studio del ctDNA attraverso la biopsia liquida affianca il tradizionale metodo basato sull'analisi del tessuto tumorale e rappresenta una tecnologia ritenuta altamente sensibile e specifica per ottenere il profilo genetico e mutazionale del tumore, in vari tipi di cancro.

ONCOREVOLUTION LIQUID BIOPSY®

È un test di screening non invasivo finalizzato all'identificazione e alla caratterizzazione mediante NGS (Next Generation Sequencing) del DNA tumorale circolante. Si tratta di un test basato sulla biopsia liquida e finalizzato alla caratterizzazione delle aberrazioni genomiche, associate a vari tumori solidi. Il ctDNA isolato viene analizzato mediante una strategia di sequenziamento ad alta profondità di lettura, al fine di identificare diverse classi di mutazioni, variazioni di singolo nucleotide (SNVs), inserzioni/delezioni, variazioni del numero di copie (CNVs) e fusioni associate a tumori solidi. Il test prevede l'analisi di 77 geni **Tab. 1**, inclusi quelli annoverati nelle linee guida del NCCN (National Comprehensive Cancer Network) **Tab. 2** che si sono dimostrate utili nello studio molecolare del tessuto tumorale e frequentemente associati a tumori solidi. Questo pannello inoltre prevede l'analisi di geni associati a resistenza ai chemioterapici.

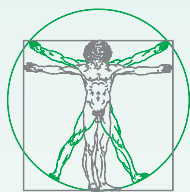


Tab. 1

Assay targets

Gene	Seq Target	SNV	Indel *	Fusion **	CNV **
ABL1	Selected Regions	•			
AKT1	Selected Regions	•			
AKT2	Selected Regions	•			
ALK	Selected Regions	•	•	•	•
APC	All Coding Regions	•	•		
AR	All Coding Regions	•			
ARAF	Selected Regions	•			
BRAF	Selected Regions	•	•		
BRCA1	All Coding Regions	•			
BRCA2	All Coding Regions	•			
CCND1	All Coding Regions	•			
CCND2	All Coding Regions	•			
CCND3	All Coding Regions	•			
CD274	All Coding Regions	•			
CDK4	All Coding Regions	•			
CDK6	Selected Regions	•			
CDKN2A	All Coding Regions	•			
CSF1R	Selected Regions	•			
CTNNB1	Selected Regions	•	•		
DDR2	Selected Regions	•			
DPYD	Selected Regions	•			
EGFR	All Coding Regions	•	•		•
ERBB2	All Coding Regions	•			
ESR1	All Coding Regions	•			
EZH2	Selected Regions	•			
FBXW7	All Coding Regions	•			
FGFR1	Selected Regions	•			
FGFR2	Selected Regions	•		•	•
FGFR3	Selected Regions	•		•	•
FLT1	Selected Regions	•			
FLT3	Selected Regions	•			
FLT4	Selected Regions	•			
GATA3	Selected Regions	•			
GNA11	Selected Regions	•			
GNAQ	Selected Regions	•			
GNAS	Selected Regions	•			
IDH1	Selected Regions	•			
IDH2	Selected Regions	•			
JAK2	Selected Regions	•			

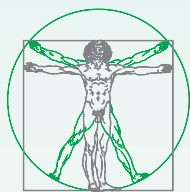
Gene	Seq Target	SNV	Indel *	Fusion **	CNV **
JAK3	Selected Regions	•			
KDR	Selected Regions	•			
KEAP1	All Coding Regions	•			
KIT	Selected Regions	•	•		
KRAS	All Coding Regions	•			
MAP2K1	Selected Regions	•			
MAP2K2	Selected Regions	•			
MET	All Coding Regions	•	•		•
MLH1	All Coding Regions	•			
MSH2	All Coding Regions	•			
MSH6	All Coding Regions	•			
MTOR	Selected Regions	•			
NF2	All Coding Regions	•			
NFE2L2	Selected Regions	•			
NRAS	Selected Regions	•			
NTRK1	Selected Regions	•		•	•
PDCD1LG2	All Coding Regions	•			
PDGFRA	Selected Regions	•			
PDGFRB	Selected Regions	•			
PIK3CA	Selected Regions	•	•		
PIK3R1	Selected Regions	•			
PMS2	All Coding Regions	•			
PTCH1	Selected Regions	•			
PTEN	All Coding Regions	•	•		
RAF1	Selected Regions	•			
RB1	All Coding Regions	•			
RET	Selected Regions	•		•	•
RNF43	Selected Regions	•			
ROS1	Selected Regions	•		•	•
SMAD4	All Coding Regions	•			
SMO	Selected Regions	•			
STK11	All Coding Regions	•			
TP53	All Coding Regions	•			
TERT Promoter	Selected Regions	•			
TSC1	Selected Regions	•	•		
TSC2	Selected Regions	•			
UGT1A1	Selected Regions	•			
VHL	All Coding Regions	•	•		



Tab. 2

Gene	Tipi di tumori associati
AKT1	Mammella, polmone, Colon-Retto*
BRAF	Melanoma*, Colon-Retto*, Polmone, Ovarico, Gastrico, Glioma, Tiroide, Pancreas, Prostata
EGFR	Polmone*, Head & Neck, Prostata
ERBB2	Mammella, Polmone
FOXL2	Ovarico
GNA11	Melanoma
GNAQ	Melanoma
KIT	Gastrico, Melanoma*, Carcinoma Timico
KRAS	Colon-Retto*, Gastrico, Polmone*, Ovarico, Tiroide, Endometrio, Pancreas, Prostata
MET	Polmone*, Colon-Retto, Gastrico
NRAS	Colon-Retto*, Polmone, Melanoma, Tiroide
PDGFRA	Gastrico, Melanoma
PIK3CA	Polmone, Mammella, Prostata, Colon-Retto, Ovarico, Head & Neck, Pancreas, Tiroide
RET	Polmone*, Tiroide
TP53	Polmone, Melanoma, Ovarico, Colon-Retto, Mammella, Endometrio, Head & Neck, Rene, Pancreas, Prostata, Tiroide

* Linee guida NCCN per tipo di tumore.



Come si esegue il test

Il test si esegue attraverso un semplice prelievo di sangue. Tramite un articolato processo di laboratorio il ctDNA viene isolato e sottoposto a sequenziamento delle regioni geniche di interesse mediante l'impiego di tecniche di Next Generation Sequencing (NGS). Tali regioni verranno successivamente analizzate mediante una complessa analisi bioinformatica, per individuare la presenza di eventuali varianti geniche.

Indicazioni al Test ONCOREVOLUTION LIQUID BIOPSY®

L'esame della biopsia liquida rappresenta un test volto alla caratterizzazione molecolare di una lesione tumorale a scopo predittivo in alternativa al test tradizionale su biopsia tissutale nelle seguenti circostanze:

- 1) **Recidiva di malattia:** monitoraggio della risposta terapeutica.
- 2) **Alla diagnosi:** prima caratterizzazione molecolare, solo nel caso non sia possibile eseguire analisi su biopsia tissutale diagnostica (biopsia non tecnicamente effettuabile; oppure prelievo bioptico non idoneo per quantità o qualità).
- 3) In soggetti con **storia familiare di tumore** correlato a mutazioni nei geni presenti nel pannello indagato.
- 4) Nota **predisposizione genetica** per tumore ereditario.
- 5) Soggetti che hanno una **storia per prolungata esposizioni ad agenti cancerogeni o sottoposti a prolungate terapie ormonali**.
- 6) Soggetti con **malattie infettive croniche** predisponenti allo sviluppo tumorale.

Risultati possibili con ONCOREVOLUTION LIQUID BIOPSY®

- **Risultato negativo - Assenza di mutazioni** per i geni investigati. Tuttavia non è possibile escludere che siano presenti mutazioni localizzate in regioni del genoma non investigate.
- **Risultato positivo - Presenza di mutazioni**

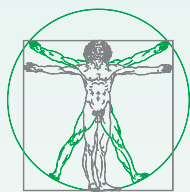
Tale risultato deve essere interpretato nel contesto della storia clinica del paziente e correlato allo stadio della malattia, ai risultati di imaging e ad altri dati di laboratorio.

Accuratezza del Test

Le tecniche di sequenziamento del DNA utilizzate, producono risultati con una sensibilità maggiore del 99% nel rilevare le mutazioni, ove presenti, associate ai geni analizzati. Tuttavia bisogna sempre tener conto dei limiti del test.

Limiti del test

In alcuni casi, il risultato dell'analisi potrebbe rilevare una variante o una mutazione del DNA con un significato clinico non noto in base alle attuali conoscenze medico-scientifiche. L'interpretazione dei risultati ottenuti dall'analisi si basa sulle più recenti conoscenze scientifiche disponibili al momento dell'analisi. Tali interpretazioni potrebbe cambiare in futuro con l'acquisizione di nuove conoscenze sulla



struttura del genoma ed influire sulla valutazione stessa delle varianti identificate.

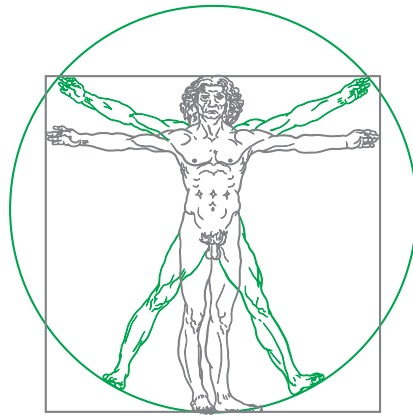
Limite intrinseco della metodica NGS utilizzata è la mancanza di uniformità di coverage per ciascuna regione genica analizzata. Tale limite si traduce nella possibilità, che specifiche mutazioni dei geni selezionati potrebbero non essere state rilevate dal test.

In caso di tumori che non abbiano ancora rilasciato in circolo DNA tumorale al momento del test, le mutazioni ricercate non saranno rilevate.

Il Test **ONCOREVOLUTION LIQUID BIOPSY®** non è finalizzato all'individuazione della predisposizione ereditaria al cancro e non è stato progettato come strumento diagnostico per il tumore, ma il suo utilizzo deve sempre essere affiancato da un'attenta valutazione del paziente anche attraverso metodiche tradizionali quali la biopsia tissutale e tecniche di imaging.

Il test non può sostituire la valutazione clinica di un medico.

Gli studi di imaging, o la biopsia tradizionale dei tessuti sono considerati ad oggi, le metodiche gold standard per la diagnosi di cancro.



AMES
Group

GENETICA MEDICA • MICROBIOLOGIA • PATOLOGIA CLINICA