

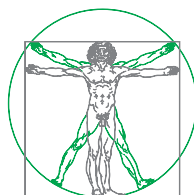


ONCOREVOLUTION

Liquid BIOPSY

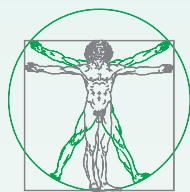
Revolution Oncology Diagnostics

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 1.000 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 tissutale 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 (cell free DNA, cfDNA) è rilasciato dalle cellule dell'organismo nel torrente circolatorio, durante i normali processi di apoptosi (morte cellulare programmata) e ricambio cellulare. 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 (circulating tumor DNA, ctDNA). Diversi studi scientifici hanno dimostrato che la quantità di ctDNA correla con la dimensioni e lo stadio del tumore; infatti tumori in fase avanzata (IV stadio) presentano circa 100-10.000 copie di ctDNA in 5 mL di plasma rispetto alle circa 10 copie riscontrate nei tumori in uno stadio precoce.

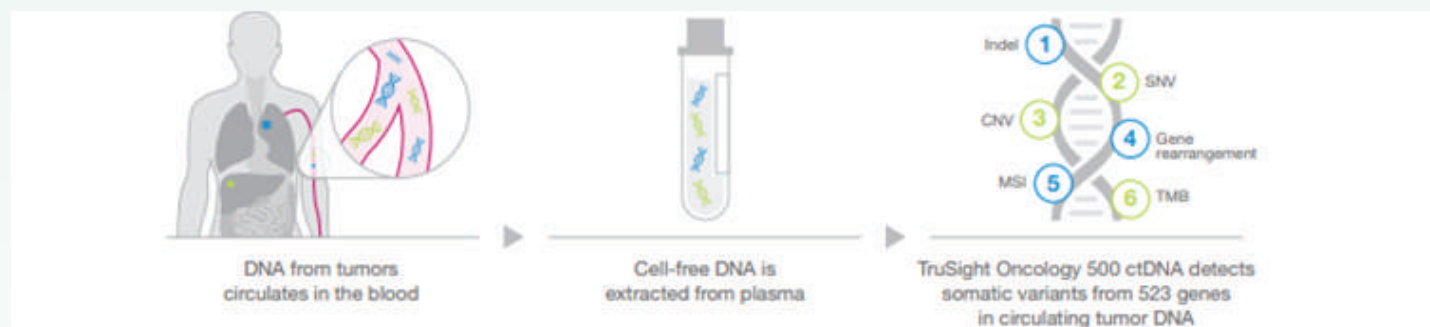


Figura I. La biopsia liquida permette la caratterizzazione dei biomarcatori per diversi tipi di varianti e diversi tipi di tumori

TSO500 ctDNA (biopsia liquida)

Lo studio del ctDNA attraverso la biopsia liquida affianca il tradizionale metodo d'analisi su 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.

La divisione di genetica dedicata all'oncologia del Centro AMES mette a disposizione del paziente oncologico e di quello ad alto rischio di sviluppare neoplasie il test di screening TruSight Oncology 500 ctDNA non invasivo finalizzato all'identificazione e alla caratterizzazione del DNA tumorale circolante ed alle eventuali aberrazioni presenti in esso. 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 riarrangiamenti associati a tumori solidi. Il TSO500 ctDNA copre 523 geni selezionati sulla base delle linee guida fornite da organizzazioni internazionali quali il National Comprehensive Cancer Network (NCCN) e la Società Europea di Oncologia Medica (ESMO). Nell'analisi sono stati inseriti anche due nuovi biomarcatori che stanno assumendo un significato diagnostico sempre maggiore nel monitoraggio e nella prognosi delle patologie tumorali quali, il carico mutazionale tumorale (Tumor Mutational Burden TMB) e l'instabilità microsatellitare (Microsatellite Instability, MSI). L'esame viene effettuato con la tecnica del sequenziamento massivo parallelo (NGS - Next Generation Sequencing) su sequenziatore Illumina NovaSeq6000, una nuova piattaforma che consente, grazie alla produzione simultanea di miliardi di sequenze di DNA, di costruire una mappa dei geni coinvolti in numerose patologie per un alto numero di campioni in contemporanea.

Variant type	Relevant examples
SNVs and indels	EGFR, POLE, TMPRSS2, BRAF
DNA rearrangements	ALK, ROS1, NTRK, RET
CNVs	HER2
MSI	MSI-Score
TMB	TMB-Score

Tabella I. Di seguito sono elencate le classi di varianti identificate dal TSO500 ctDNA, insieme ai nuovi biomarcatori pan-tumoriali

Come funziona il test

A partire da un semplice prelievo di sangue il Trusight Oncology 500 ctDNA offre un metodo di analisi integrato per l'identificazione delle varianti somatiche, ovvero quelle presenti solo nel tessuto tumorale sfruttando una tecnologia ad arricchimento di sequenze. Il metodo di arricchimento consiste nell'ibridizzare le regioni di interesse con delle sonde che vengono catturate su biglie magnetiche ricoperte di streptavidina ed, infine, eluite per arricchire il pool della libreria. Le librerie così ottenute vengono quindi raggruppate e sequenziate. Questo permette di migliorare sensibilmente l'affidabilità dei dati ottenuti.

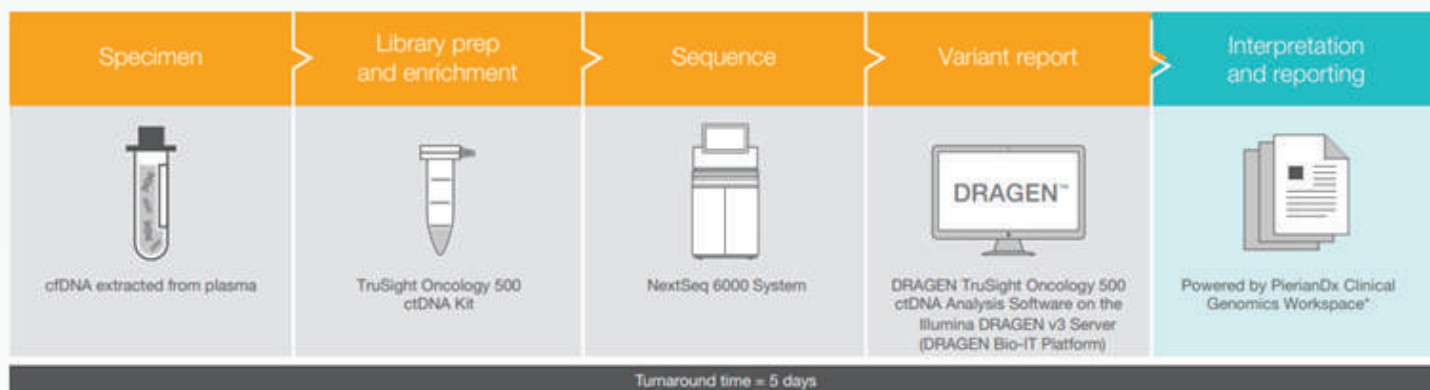


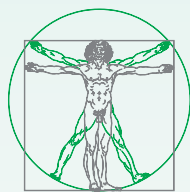
Figura 2. Il test TruSight Oncology 500 ctDNA si integra nei flussi di lavoro di laboratorio attuali, passando dagli acidi nucleici all'identificazione delle varianti in 3-5 giorni

Analisi del TMB ed MSI

Il TrusightOncology 500 ctDNA è studiato per ottenere informazioni su TMB ed MSI, marcatori di fondamentale importanza nel trattamento delle neoplasie in quanto correlati con la risposta a immunoterapie. Entrambi i tipi di marcatori si basano sull'analisi simultanea di più loci genomici. In particolare, il Tumor Mutational Burden (TMB) è un valore che indica il numero di mutazioni non sinonime entro la regione codificante di un genoma tumorale e costituisce uno dei marcatori prognostici emergenti che correla più strettamente con la risposta immunoterapica. L'instabilità microsatellitare (MSI) deriva da difetti nei geni del riparo (mismatchrepair, MMR) ed è tradizionalmente analizzata tramite PCR e immunostochimica. Grazie alle tecniche di sequenziamento di nuova generazione, quali il TSO 500 ctDNA, è possibile eseguire l'analisi di un maggior numero di questi marcatori, con la possibilità, pertanto, di offrire la più alta risoluzione al momento disponibile e di identificare così, nuovi profili di instabilità microstellitare (76 omopolimeri in simultanea vs 5 del pannello Bethesda).

Report TruSightOncology 500 ctDNA

I dati dei campioni analizzati mediante TruSightOncology 500 ctDNA vengono elaborati attraverso complessi software bioinformatici, che automatizzano l'intero processo di analisi evitando interferenze tecniche e producendo come risultato finale un cancer report disegnato specificamente per andare incontro alle esigenze dell'oncologo. Questo documento riporta in prima pagina sinteticamente, tramite un sommario, i risultati più importanti dell'analisi quali: i biomarcatori quali TMB ed MSI, nonché le mutazioni



“actionable” (ovvero potenziali bersagli di farmaci molecolari) e gli studi clinici in corso in tutto il mondo sulle mutazioni riscontrate.

La stima del Tumormutationalburden (TMB) ovvero il numero di mutazioni nella regione codificante del genoma tumorale, è un parametro che permette di valutare la responsività del tumore all’immunoterapia (espresso come mutazioni/Mb). Il TMB generalmente è calcolato per il Whole ExomeSequencing (WES) ma comparando i risultati ottenuti dal WES con quelli ottenuti con il pannello TruSightOncology 500 ctDNA si è osservato che questo ultimo approccio sia in grado di calcolare il TMB per i campioni tumorali in maniera altamente efficace e paragonabile all’analisi dell’intero esoma. Nel TruSightOncology 500 ctDNA il calcolo del TMB è stato reso più affidabile grazie a diversi criteri di valutazione delle varianti:

- rimozione delle varianti nelle regioni a bassa confidenza
- rimozione delle varianti driver che possono creare una distorsione nella stima del TMB
- filtraggio delle varianti germinali tramite comparazione con database contenenti varianti di popolazione

Nelle pagine successive del report, i risultati riassunti nel sommario sono esposti in maniera più dettagliata mostrando la classificazione delle varianti identificate in più gruppi basati sulla significatività clinica (**classificazione Tier**) e riportando anche i riferimenti ai dati di letteratura. Per ogni mutazione riscontrata, il report fornisce informazioni sul significato clinico della stessa, indicando il numero di evidenze prognostiche, diagnostiche, predittive di risposta alla terapia, rilevate in letteratura. Queste informazioni sono di estrema importanza per l’oncologo che in questo modo può decidere di intraprendere una strategia mirata ed efficace per il trattamento del tumore.

Nella sezione Tier IA e Tier IB sono presenti, rispettivamente, varianti dal forte significato clinico nel tumore in analisi per le quali esistono trattamenti approvati dalla Food And DrugAdministration (FDA) per cui non è ancora disponibile nessun trattamento ad oggi approvato ufficialmente, ma oggetto di studio attualmente. In questa sezione è possibile trovare anche eventuali mutazioni di resistenza verso terapie già disponibili.

Nella sezione Tier IIC del report vengono riportate informazioni sulle mutazioni che sono annoverate tra quelle dal potenziale significato clinico, per la quali esistono evidenze di patogenicità in altri tipi di tumori ma non in quello in oggetto. Tutte queste informazioni possono essere utili al medico per capire in che modo il tumore potrebbe evolvere.

Nella sezione Tier IID vengono riportate ulteriori varianti riscontrate in studi preclinici dal potenziale significato clinico.

Nella sezione Tier III vengono riportate mutazioni per cui non è noto il significato clinico (VUS, Variant of UnknownSignificance).

Nella sezione Tier IV sono riportate le mutazioni che ricadono in regioni non codificanti e pertanto ritenute benigne o verosimilmente benigne.

In conclusione, possiamo affermare che il *CancerGenome* report ottenuto dall'analisi TruSightOncology 500 ctDNA è uno strumento dinamico che fornisce all'oncologo tutte le informazioni necessarie per poter mettere a punto strategie terapeutiche mirate in base alla mutazione riscontrata o alle eventuali molteplici mutazioni, di fare previsioni sulla prognosi e inoltre di poter essere utilizzato per monitorare nel tempo l'andamento della risposta terapeutica.

Perchè scegliere il test TruSightOncology 500 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.

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.

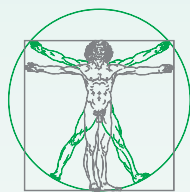
A chi è rivolto il test TruSightOncology 500 ctDNA?

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:

- Recidiva di malattia: monitoraggio della risposta terapeutica.
- 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).
- In soggetti con storia familiare di tumore correlato a mutazioni nei geni presenti nel pannello indagato.
- Soggetti che hanno una storia di prolungata esposizione ad agenti cancerogeni o sottoposti a prolungate terapie ormonali.
- Soggetti con malattie infettive croniche predisponenti allo sviluppo tumorale.

Accuratezza del Test:

Le tecniche di sequenziamento del DNA utilizzate, producono risultati con un'accuratezza prossima al 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 della stessa. Alcune varianti potrebbero non essere ancora state identificate o validate come patogenetiche dalla comunità scientifica al momento dell'analisi. Tale interpretazione potrebbe cambiare in futuro con l'acquisizione di nuove conoscenze sulla struttura del genoma ed influire sulla valutazione stessa delle varianti identificate.

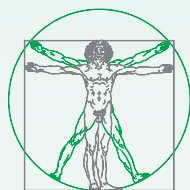
In caso di tumori che non abbiano ancora rilasciato in circolo DNA tumorale al momento del test, le mutazioni ricercate non saranno rilevate.

Il Test **TSO500 ctDNA** non è finalizzato all'individuazione della predisposizione ereditaria al cancro.

Il Test **TSO500 ctDNA** non è stato progettato come strumento diagnostico per il cancro, 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.

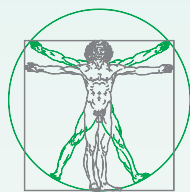
Il test non può sostituire la valutazione clinica di un medico.

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

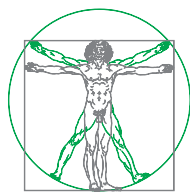


Geni inclusi in TruSight Oncology 500 ctDNA, in verde le CNV

ABL1	BRD4	CUX1	FAM175A	GATA6	IGF1	MAP3K13	NOTCH4	POLE	RPTOR	TAF1
ABL2	BRIP1	CXCR4	FAM46C	GEN1	IGF1R	MAP3K14	NPM1	PPARG	RUNX1	TBX3
ACVR1	BTG1	CYLD	FANCA	GID4	IGF2	MAP3K4	NRAS	PPM1D	RUNX1T1	TCEB1
ACVR1B	BTK	DAXX	FANCC	GLI1	IKBKE	MAPK1	NRG1	PPP2R1A	RYBP	TCF3
AKT1	C11orf30	DCUN1D1	FANCD2	GNA11	IKZF1	MAPK3	NSD1	PPP2R2A	SDHA	TCF7L2
AKT2	CALR	DDR2	FANCE	GNA13	IL10	MAX	NTRK1	PPP6C	SDHAF2	TERC
AKT3	CARD11	DDX41	FANCF	GNAQ	IL7R	MCL1	NTRK2	PRDM1	SDHB	TERT
ALK	CASP8	DHX15	FANCG	GNAS	INHA	MDC1	NTRK3	PREX2	SDHC	TET1
ALOX12B	CBFB	DICER1	FANCI	GPR124	INHBA	MDM2	NUP93	PRKAR1A	SDHD	TET2
ANKRD11	CBL	DIS3	FANCL	GPS2	INPP4A	MDM4	NUTM1	PRKCI	SETBP1	TFE3
ANKRD26	CCND1	DNAJB1	FAS	GREM1	INPP4B	MED12	PAK1	PRKDC	SETD2	TFRC
APC	CCND2	DNMT1	FAT1	GRIN2A	INSR	MEF2B	PAK3	PRSS8	SF3B1	TGFBR1
AR	CCND3	DNMT3A	FBXW7	GRM3	IRF2	MEN1	PAK7	PTCH1	SH2B3	TGFBR2
ARAF	CCNE1	DNMT3B	FGF1	GSK3B	IRF4	MET	PALB2	PTEN	SH2D1A	TMEM127
ARFRP1	CD274	DOT1L	FGF10	H3F3A	IRS1	MGA	PARK2	PTPN11	SHQ1	TMPRSS2
ARID1A	CD276	E2F3	FGF14	H3F3B	IRS2	MITF	PARP1	PTPRD	SLIT2	TNFAIP3
ARID1B	CD74	EED	FGF19	H3F3C	JAK1	MLH1	PAX3	PTPRS	SLX4	TNFRSF14

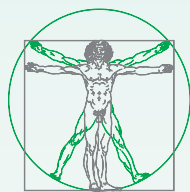


ARID2	CD79A	EGFL7	FGF2	HGF	JAK2	MLL	PAX5	PTPRT	SMAD2	TOP1
ARID5B	CD79B	EGFR	FGF23	HIST1H1C	JAK3	MLLT3	PAX7	QKI	SMAD3	TOP2A
ASXL1	CDC73	EIF1AX	FGF3	HIST1H2B D	JUN	MPL	PAX8	RAB35	SMAD4	TP53
ASXL2	CDH1	EIF4A2	FGF4	HIST1H3A	KAT6A	MRE11A	PBRM1	RAC1	SMARCA 4	TP63
ATM	CDK12	EIF4E	FGF5	HIST1H3B	KDM5A	MSH2	PDCD1	RAD21	SMARCB 1	TRAF2
ATR	CDK4	EML4	FGF6	HIST1H3C	KDM5C	MSH3	PDCD1L G2	RAD50	SMARCD 1	TRAF7
ATRX	CDK6	EP300	FGF7	HIST1H3D	KDM6A	MSH6	PDGFRA	RAD51	SMC1A	TSC1
AURKA	CDK8	EPCAM	FGF8	HIST1H3E	KDR	MST1	PDGFRB	RAD51B	SMC3	TSC2
AURKB	CDKN1A	EPHA3	FGF9	HIST1H3F	KEAP1	MST1R	PDK1	RAD51C	SMO	TSHR
AXIN1	CDKN1B	EPHA5	FGFR1	HIST1H3 G	KEL	MTOR	PDPK1	RAD51D	SNCAIP	U2AF1
AXIN2	CDKN2A	EPHA7	FGFR2	HIST1H3H	KIF5B	MUTYH	PGR	RAD52	SOCS1	VEGFA
AXL	CDKN2B	EPHB1	FGFR3	HIST1H3I	KIT	MYB	PHF6	RAD54L	SOX10	VHL
B2M	CDKN2C	ERBB2	FGFR4	HIST1H3J	KLF4	MYC	PHOX2B	RAF1	SOX17	VTCN1
BAP1	CEBPA	ERBB3	FH	HIST2H3A	KLHL6	MYCL1	PIK3C2B	RANBP2	SOX2	WISP3
BARD1	CENPA	ERBB4	FLCN	HIST2H3C	KMT2B	MYCN	PIK3C2G	RARA	SOX9	WT1
BBC3	CHD2	ERCC1	FLI1	HIST2H3D	KMT2C	MYD88	PIK3C3	RASA1	SPEN	XIAP
BCL10	CHD4	ERCC2	FLT1	HIST3H3	KMT2D	MYOD1	PIK3CA	RB1	SPOP	XPO1
BCL2	CHEK1	ERCC3	FLT3	HLA-A	KRAS	NAB2	PIK3CB	RBM10	SPTA1	XRCC2

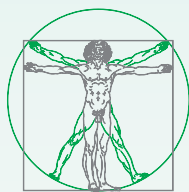


BCL2L1	CHEK2	ERCC4	FLT4	HLA-B	LAMP1	NBN	PIK3CD	RECQL4	SRC	YAP1
BCL2L11	CIC	ERCC5	FOXA1	HLA-C	LATS1	NCOA3	PIK3CG	REL	SRSF2	YES1
BCL2L2	CREBBP	ERG	FOXL2	HNF1A	LATS2	NCOR1	PIK3R1	RET	STAG1	ZBTB2
BCL6	CRKL	ERRF1	FOXO1	HNRNPK	LMO1	NEGR1	PIK3R2	RFWD2	STAG2	ZBTB7A
BCOR	CRLF2	ESR1	FOXP1	HOXB13	LRP1B	NF1	PIK3R3	RHEB	STAT3	ZFHX3
BCORL1	CSF1R	ETS1	FRS2	HRAS	LYN	NF2	PIM1	RHOA	STAT4	ZNF217
BCR	CSF3R	ETV1	FUBP1	HSD3B1	LZTR1	NFE2L2	PLCG2	RICTOR	STAT5A	ZNF703
BIRC3	CSNK1A1	ETV4	FYN	HSP90AA1	MAGI2	NFKBIA	PLK2	RIT1	STAT5B	ZRSR2
BLM	CTCF	ETV5	GABRA6	ICOSLG	MALT1	NKX2-1	PMAIP1	RNF43	STK11	
BMPR1A	CTLA4	ETV6	GATA1	ID3	MAP2K1	NKX3-1	PMS1	ROS1	STK40	
BRAF	CTNNA1	EWSR1	GATA2	IDH1	MAP2K2	NOTCH1	PMS2	RPS6KA4	SUFU	
BRCA1	CTNNB1	EZH2	GATA3	IDH2	MAP2K4	NOTCH2	PNRC1	RPS6KB1	SUZ12	
BRCA2	CUL3	FAM123B	GATA4	IFNGR1	MAP3K1	NOTCH3	POLD1	RPS6KB2	SYK	

1. Gibney GT, Weiner LM, Atkins MB. Predictive biomarkers for checkpoint inhibitor-based immunotherapy. *Lancet Oncol.* 2016;17(12):e542-e551. doi: 10.1016/S1470-2045(16)30406-5.
2. Champiat S, Ferté C, Lebel-Binay S, Eggermont A, Soria JC. Exomics and immunogenics: Bridging mutational load and immune checkpoints efficacy. *Oncoimmunology.* 2014;3(1):e27817.
3. Zou W, Wolchok JD, Chen L. PD-L1 (B7-H1) and PD-1 pathway blockade for cancer therapy: Mechanisms, response biomarkers, and combinations. *Sci Transl Med.* 2016;8(328):328rv4. doi:10.1126/scitranslmed.aad7118.
4. Pitt J, Vétizou M, Daillère R, et al. Resistance Mechanisms to Immune-Checkpoint Blockade in Cancer: Tumor-Intrinsic and-Extrinsic Factors. *Immunity.* 2016;44(6):1255-1269.
5. Morrison C. Financial toxicity looms as cancer combinations proliferate. *Nat Biotechnol.* 2015;33(8):783-784.
6. Michot J, Bigenwald C, Champiat S, et al. Immune-related adverse events with immune checkpoint blockade: a comprehensive review. *Eur J Cancer.* 2016;54:139-148.
7. Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, et al. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science.* 2015;348 (6230):124-128.
8. Snyder A, Makarov V, Merghoub T, et al. Genetic Basis for Clinical Response to CTLA-4 Blockade in Melanoma. *N Engl J Med.* 2014;371(23):2189-2199.
9. van Allen EM, Miao D, Schilling B, Shukla SA, Blank C, Zimmer L. Genomic correlates of response to CTLA-4 blockade in metastatic melanoma. *Science.* 2015;350(6257):207-211.
10. Garofalo A, Sholl L, Reardon B, et al. The impact of tumor profiling approaches and genomic data strategies for cancer precision medicine. *Genome Med.* 2016;8(1):79. doi:10.1186/s13073-016-0333-9.
11. Campesato, L, Barroso-Sousa, R, Jimenez, L, et al. Comprehensive cancer gene panels can be used to estimate mutational load and predict clinical benefit to PD-1 blockade in clinical practice. *Oncotarget.* 2015;6(33):34221-34227.
12. Ashord, M. Cancer Gene Panels Could Help to Identify Patients for Immunotherapy, Studies Suggest. *Genome Web.* www.genomeweb.com/cancer/cancer-gene-panels-could-help-identify-patients-immunotherapy-studies-suggest. Updated April 29, 2016. Accessed February 2, 2017.
13. TruSight Tumor 170. www.illumina.com/TruSightTumor170. Accessed January 18, 2017.
14. The Cancer Genome Atlas. cancergenome.nih.gov/. Accessed January 16, 2017.



15. Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(1):308-311.
16. 1000 Genomes Project Consortium. A global reference for human genetic variation. *Nature.* 2015;526(7571):68-74.
17. NHLBI Exome Sequencing Project (ESP). evs.gs.washington.edu/EVS/. Accessed January 27, 2017.
18. ExAC Browser. exac.broadinstitute.org/. Accessed January 27, 2017.
19. Tennessen JA, Bigham AW, O'Connor TD, et al. Evolution and functional impact of rare coding variation from deep sequencing of human exomes. *Science.* 2012;337(6069):64-69
20. Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature.* 2016;536(7616):285-291.
21. Forbes SA, Beare D, Gunasekaran P, et al. COSMIC: exploring the world's knowledge of somatic mutations in human cancer. *Nucleic Acids Res.* 2015;43:D805–D811. doi: 10.1093/nar/gku1075.
22. Illumina (2016) TruSeq Exome Library Prep Kit (www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/truseq-exome-data-sheet-770-2015-007.pdf).
23. van Nimwegen KJ, van Soest RA, Veltman JA, et al. Is the \$1000 Genome as Near as We Think? A Cost Analysis of Next-Generation Sequencing. *Clin Chem.* 2016;62(11):1458-1464.
24. Feliubadaló L, Tonda R, Gausachs M, et al. Benchmarking of Whole Exome Sequencing and Ad Hoc Designed Panels for Genetic Testing of Hereditary Cancer. *Sci Rep.* 2017;7:37984. doi: 10.1038/srep37984.



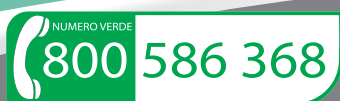
AMES
Group
GENETICA MEDICA • MICROBIOLOGIA • PATOLOGIA CLINICA



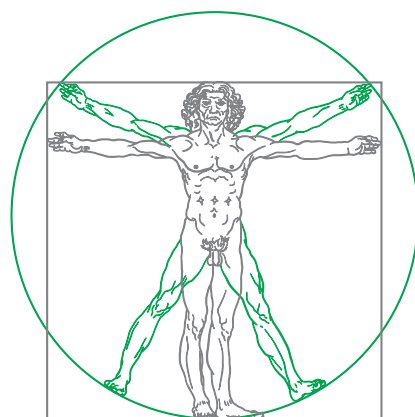
ONCOREVOLUTION
Liquid BIOPSY Revolution Oncology Diagnostics

www.centroames.it

P.I.: 02982591212 - Reg. Imp. di Napoli 01730460639 - N. R.E.A. 316414



AMES Centro Polidiagnostico Strumentale Srl
Via Padre Carmine Fico, 24 - 80013 Casalnuovo di Napoli (NA)
Tel. e Fax 081 5224316 pbx - 081 8420923 - 081 5227785 - 081 5227636
informazioni@centroames.it - www.centroames.it
P.I.: 02982591212 - Reg. Imp. di Napoli 01730460639 - N. R.E.A. 316414



AMES
Group

GENETICA MEDICA • MICROBIOLOGIA • PATOLOGIA CLINICA