



## Il ruolo della biopsia liquida nella diagnosi e monitoraggio delle resistenze alla terapia in pazienti con NSCLC

Fiamma Buttitta, Antonio Marchetti

*CeSI-Met, Università degli Studi di Chieti*

### INTRODUZIONE

In questi ultimi anni, l'individuazione di un numero crescente di biomarcatori predittivi di risposta a specifici trattamenti con farmaci biologici antineoplastici ha modificato notevolmente i protocolli oncologici. Una delle patologie tumorali che, con l'introduzione nella pratica clinica degli inibitori tirosino-chinasici (TKI) anti-EGFR, ha beneficiato maggiormente di tale rivoluzione farmacologica è l'adenocarcinoma polmonare in fase metastatica.

Alla data attuale, l'oncologo può stabilire il trattamento solo dopo che sia stato definito lo

stato mutazionale di due importanti marcatori EGFR e ALK predittivi di risposta,<sup>1</sup> ma in un prossimo futuro sarà richiesto anche l'assetto genetico di altri marcatori quali ROS1, BRAF, HER2, KRAS ed altri ancora.

Alcune determinazioni molecolari sono realizzate in situ in quanto richiedono sezioni istologiche per analisi immunohistochimiche o di ibridazione (FISH) a scopo predittivo; altre determinazioni sono in vitro e richiedono sezioni di tessuto o campioni citologici per l'estrazione del DNA. Pertanto, la diagnosi morfologica con annessa caratterizzazione immunohistochimica e le analisi molecolari per la migliore scelta terapeutica richiedono globalmente la disponibilità di una quota consistente di tessuto tumorale.

Circa il 30% dei pazienti affetti da cancro polmonare è sottoposta ad intervento chirurgico. Per tali pazienti si dispone di abbondante tessuto. Per i rimanenti pazienti la diagnosi è affidata a campioni biotici che talora risultano poveri di cellule neoplastiche a seguito della caratterizzazione istologica, e pertanto non idonei per l'esecuzione di test molecolari.

Anche i campioni citologici possono presentare problemi di adeguatezza e creare difficoltà al patologo in quanto a seguito del loro utilizzo si può perdere la documentazione della diagnosi effettuata.

Questa problematica clinica emerge anche da ampi trials clinici, quali IPASS ed INTEREST, che hanno sottolineato una scarsità di



materiale biologico da destinare ad analisi molecolari nel 20-50% dei pazienti con cancro polmonare in fase avanzata o metastatica. Tutte queste motivazioni giustificano il forte interesse della comunità scientifica e medica oncologica verso un materiale biologico alternativo, più facilmente accessibile, come la biopsia liquida.

Gli studi pubblicati finora sull'argomento hanno dimostrato l'affidabilità dei test molecolari per l'individuazione delle mutazioni di EGFR a partire da DNA libero circolante (cfDNA).

Per tale motivo, nel 2014, l'EMA ha approvato l'utilizzo del plasma per la determinazione dello stato mutazionale di EGFR in funzione del trattamento con TKI qualora non sia possibile eseguire il test su tessuto/citologia per mancanza di materiale neoplastico idoneo.

## ANALISI MUTAZIONALI DI EGFR SU PLASMA

L'utilizzo della biopsia liquida per indagini mutazionali rappresenta attualmente un settore in rapida espansione sia in ambito di ricerca traslazionale sia in ambito di diagnostica molecolare oncologica per i pazienti affetti da adenocarcinoma polmonare, in funzione della migliore scelta terapeutica.

Gli studi finora condotti sono stati rivolti a varie componenti presenti nel sangue: cellule tumorali circolanti (CTC), micro-RNA, esosomi e cfDNA. Il maggiore interesse è attualmente concentrato sul cfDNA e in particolare sul DNA tumorale circolante (ctDNA) che rappresenta in molti casi una piccola frazione rispetto a tutta la quota di DNA proveniente dalle cellule normali presente nel plasma.

Per l'analisi mutazionale sono state utilizzate varie procedure che differiscono per sensibilità e specificità. Sulla base degli studi finora pubblicati, appare chiaro che le procedure più idonee sono quelle caratterizzate da elevata sensibilità, in considerazione dei livelli di ctDNA che potrebbero rappresentare una minima frazione rispetto alla totalità del cfDNA.

Fra le metodiche ad alta sensibilità maggior-

mente utilizzate, vanno citate le metodiche specifiche per il target mutato, quali la metodica ARMS con primer scorpion, la PNA-LNA clamp e la PCR digitale<sup>2-3</sup>, mentre nell'ambito delle metodiche di sequenziamento basato su PCR, che amplificano sia il DNA normale che mutato, il deep-NGS (sequenziamento di seconda generazione in profondità) consente di evidenziare rari alleli mutati in virtù dell'alto numero di sequenze effettuate.<sup>4-5</sup>

Nella pratica clinica è preferibile optare per procedure ad alta sensibilità che, utilizzate nel contesto di kit commerciali con controlli interni positivi e negativi, risultano standardizzate e che richiedono piattaforme altamente tecnologiche.

Recentemente, abbiamo valutato l'affidabilità del test mutazionale su sangue mettendo a confronto due metodiche, il deep-NGS su piattaforma GS Junior 454 e la real-time PCR allele-specifica mediante kit cobas "EGFR V2 Mutation test" su piattaforma cobas z 480.<sup>6</sup>

Per questa finalità abbiamo analizzato il sangue di 69 pazienti affetti da adenocarcinoma polmonare, localmente avanzato o metastatico, positivi per mutazioni di EGFR su tessuto neoplastico e di 21 individui di controllo privi di mutazioni di EGFR.

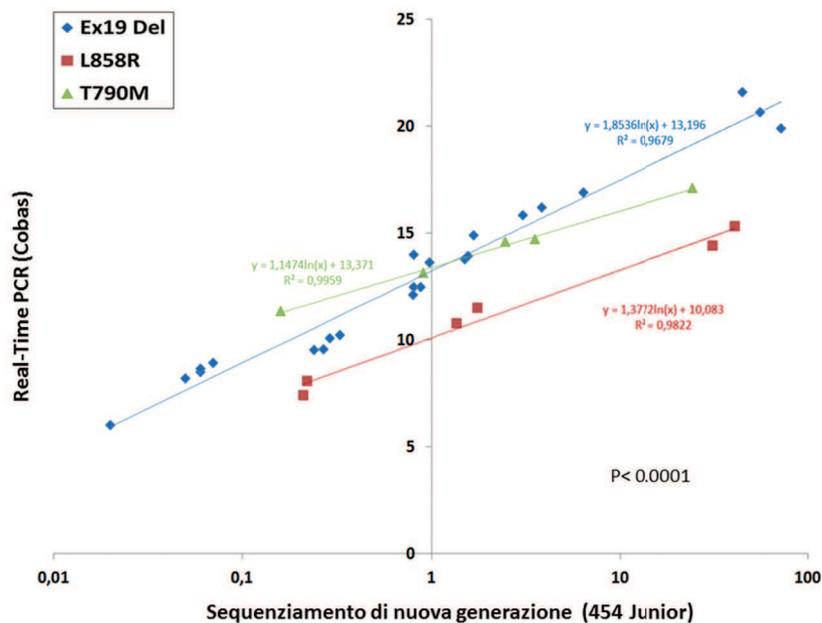
Per ogni test mutazionale sono stati utilizzati 2ml di plasma dai quali è stato estratto il cfDNA con kit cobas "cfDNA Sample Preparation" che utilizza colonnine dedicate all'estrazione di DNA da plasma.

Il test mutazionale è stato condotto con il kit cobas "EGFR V2 Mutation test" che utilizza controlli interni positivi e negativi per l'amplificazione PCR allele-specifica.

La sensibilità dell'analisi real-time cobas e dell'analisi NGS sul plasma prelevato prima del trattamento, in confronto all'analisi su tessuto, è stata del 72% e 74% rispettivamente.

La specificità è risultata del 100%. La concordanza dei dati è risultata molto elevata (R2 > 95%) (Fig. 1).

In particolare, il test in real-time ha rivelato una grande sensibilità riuscendo ad evidenziare mutazioni di EGFR anche quando presenti in concentrazioni bassissime come documentato dal sequenziamento in NGS (Tab. 1).



**Figura 1**

Comparazione dei dati quantitativi ottenuti mediante cobas e sequenziamento di seconda generazione su scala logaritmica. L'indice di correlazione  $R^2$  indica una forte correlazione fra i due parametri.

A		
Case N.	Exon 19 Del NGS	Exon 19 Del cobas
21	0.02	5.99
23	0.05	8.19
6	0.06	8.49
10	0.06	8.62
4	0.07	8.91
22	0.24	9.5
35	0.27	9.55
37	0.29	10.04
42	0.33	10.2
15	0.8	12.07
31	0.81	12.44
19	0.88	12.45
25	0.98	13.59
2	1.51	13.74
8	1.57	13.91
32	0.81	13.97
30	1.68	14.86
13	3.05	15.82
8	3.84	16.18
28	6.42	16.88
16	45.29	21.58
20	55.83	20.62
26	72.06	19.88

Tabella 1. Sono riportati a confronto i valori di quantificazione ottenuti mediante cobas e sequenziamento di seconda generazione.

B		
Case N.	L858R NGS	L858R cobas
17	0.21	7.04
18	0.22	8.04
36	1.37	10.74
14	1.76	11.48
7	31.38	14.39
38	41.17	15.29

C		
Case N.	T790M NGS	T790M cobas
31	0.16	11.34
28	0.91	13.11
26	2.46	14.57
20	3.55	14.7
7	24.5	17.08

## LA BIOPSIA LIQUIDA PER IL MONITORAGGIO DEI PAZIENTI CON NSCLC

La biopsia liquida rappresenta una procedura clinica non invasiva che consente di effettuare saggi mutazionali ripetibili nel tempo idonei al monitoraggio dello stato di malattia neoplastica.

Alcuni studi hanno esplorato con successo questa possibilità<sup>7</sup> ed è stato inoltre dimostrato che il monitoraggio delle mutazioni di EGFR nel sangue consente di evidenziare la presenza di mutazioni inducenti resistenza, quali la T790M, anche vari mesi prima della evidenza clinica di progressione di malattia.<sup>8</sup>

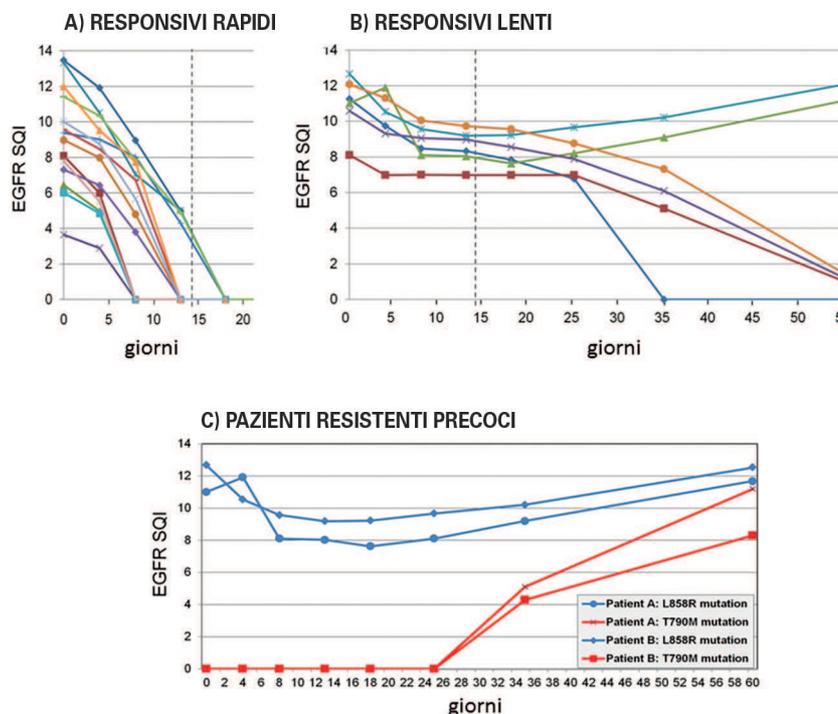
Gli studi condotti sul monitoraggio hanno solo recentemente esplorato la possibilità di “quantificare” la presenza degli alleli mutati nel sangue. Nell’ambito di una casistica di 27 pazienti, affetti da adenocarcinoma polmonare con

mutazioni di EGFR nel tumore primitivo e nel plasma prelevato prima della terapia, abbiamo deciso di monitorare l’effetto dei TKI fin dai primi giorni di trattamento, dal quarto al sessantesimo, e successivamente ogni due mesi a partire dalla scomparsa di alleli mutati nel sangue.<sup>6</sup>

L’analisi mutazionale è stata condotta utilizzando i metodi di estrazione e amplificazione sopra menzionati; la piattaforma cobas z 480 per la detezione della mutazione EGFR ha utilizzato un software dedicato per la quantificazione della mutazione su plasma (EGFR Blood Analysis Package Software).

Nel 95% dei casi è emersa una riduzione progressiva dei livelli ematici di EGFR mutato fin dal quarto giorno di trattamento con un TKI anti-EGFR (erlotinib).

In particolare, la riduzione osservata era superiore al 50% entro il quattordicesimo giorno nel 70% dei pazienti esaminati, definiti quindi responsivi rapidi (Fig. 2).



**Figura 2**

Curve di risposta al trattamento con TKI ottenute mediante analisi quantitativa di mutazioni sensibilizzanti ed inducenti resistenza (T790M) in pazienti con carcinoma polmonare.

La riduzione si è realizzata molto più lentamente, con un azzeramento dei livelli ematici di EGFR mutato fra il trentacinquesimo e il sessantesimo giorno dall'inizio della terapia, per i rimanenti pazienti che si sono quindi comportati come responsivi lenti al trattamento con TKI. Inoltre, due pazienti responsivi lenti non hanno avuto un azzeramento della mutazione sensibilizzante, ma un incremento intorno al ventesimo giorno dall'inizio del trattamento (Fig. 2).

All'incremento della mutazione sensibilizzante nel plasma ha fatto seguito, in entrambi

i casi, la comparsa e l'incremento della mutazione T790M.

Dalla comparazione dei dati di "risposta molecolare" con quelli della risposta clinica è emerso che una rapida risposta plasmatica si associava significativamente ad una maggiore percentuale di riduzione della massa tumorale.

Studi clinici su una più ampia popolazione saranno necessari per stabilire il significato clinico prognostico e predittivo di una risposta molecolare precoce verso una tardiva.

#### **APPLICAZIONI CLINICHE DELLA BIOPSIA LIQUIDA**

La biopsia liquida è stata approvata recentemente soltanto per l'analisi mutazionale di EGFR nei pazienti con carcinoma polmonare che non dispongono di prelievi tissutali/citologici idonei al test molecolare.

Altra possibilità di applicazione è il monitoraggio dei pazienti in funzione del trattamento per una diagnosi precoce di ripresa di malattia, sulla base della presenza di mutazioni sensibilizzanti o inducenti resistenza.

La quantificazione delle mutazioni nel plasma potrebbe avere vari risvolti nella pratica

clinica, sia di natura predittiva che prognostica. Tuttavia, saranno necessari studi clinici multicentrici per chiarire il significato clinico della valutazione precoce di "risposta molecolare" nel plasma.

Anche in ambito di ricerca la biopsia liquida potrà essere di grande aiuto soprattutto nell'ambito di studi clinici randomizzati volti a stabilire le relazioni dose-effetto e l'efficacia di farmaci differenti.

Infine, in un prossimo futuro, grazie alla biopsia liquida sarà possibile la determinazione simultanea di altri biomarcatori molecolari mediante sequenziamento di nuova generazione.

## BIBLIOGRAFIA

1. Lindeman NI, Cagle PT, Beasley MB, Chitale DA, Dacic S, Giaccone G, Jenkins RB, Kwiatkowski DJ, Saldivar JS, Squire J, Thunnissen E, Ladanyi M. *Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology, College of American Pathologists International Association for the Study of Lung Cancer and Association for Molecular Pathology.* *J Mol Diagn.* 2013 Jul; 15 (4): 415-53
2. Xu F1, Wu J, Xue C, Zhao Y, Jiang W, Lin L, Wu X, Lu Y, Bai H, Xu J, Zhu G, Zhang L. *Comparison of different methods for detecting epidermal growth factor receptor mutations in peripheral blood and tumor tissue of non-small cell lung cancer as a predictor of response to gefitinib.* *Onco Targets Ther.* 2012;5:439-47. doi: 10.2147/OTT.S37289. Epub 2012 Dec 12.
3. T.K. F. Yung, K. C. A. Chan, T. S.K.Mok, J. Tong, K.-F. To, and Y. M. D. Lo, "Single-molecule detection of epidermal growth factor receptor mutations in plasma by microfluidics digital PCR in non-small cell lung cancer patients," *Clinical Cancer Research*, vol. 15, no. 6, pp. 2076-2084, 2009.
4. Marchetti A, Del Grammastro M, Felicioni L, Malatesta S, Filice G, Centi I, De Pas T, Santoro A, Chella A, Brandes AA, Venturino P, Cuccurullo F, Crinò L, Buttitta F. *Assessment of EGFR mutations in circulating tumor cell preparations from NSCLC patients by next generation sequencing: toward a real-time liquid biopsy for treatment.* *PLoS One.* 2014 Aug 19; 9(8)
5. Buttitta F, Felicioni L, Del Grammastro M, Filice G, Di Lorito A, Malatesta S, Viola P, Centi I, D'Antuono T, Zappacosta R, Rosini S, Cuccurullo F, Marchetti A. *Effective assessment of egfr mutation status in bronchoalveolar lavage and pleural fluids by next-generation sequencing.* *Clin Cancer Res.* 2013 Feb 1; 19(3): 691-8. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-1958. Epub 2012 Dec 14.
6. Marchetti A, Palma JF, Felicioni L, De Pas TM, Chiari R, Del Grammastro M, Filice G, Ludovini V, Brandes AA, Chella A, Malorgio F, Guglielmi F, De Tursi M, Santoro A, Crinò L, Buttitta F. *Early Prediction of Response to Tyrosine Kinase Inhibitors by Quantification of EGFR Mutations in Plasma of NSCLC Patients.* *J Thorac Oncol.* 2015 Oct; 10 (10): 1437-43.
7. Esposito A, Bardelli A, Criscitiello C, Colombo N, Gelao L, Fumagalli L, Minchella I, Locatelli M, Goldhirsch A, Curigliano G. *Monitoring tumor-derived cell-free DNA in patients with solid tumors: clinical perspectives and research opportunities.* *Cancer Treat Rev.* 2014; 40 (5): 648-55.
8. Sorensen BS1, Wu L, Wei W, Tsai J, Weber B, Nexo E, Meldgaard P. *Monitoring of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor-sensitizing and resistance mutations in the plasma DNA of patients with advanced non-small cell lung cancer during treatment with erlotinib.* *Cancer.* 2014 Dec 15; 120 (24): 3896-901.