

La biopsia liquida nel *non-small cell lung cancer*

Alessandro Audisio
Alessandro Samuelli

Il tumore polmonare non a piccole cellule (*non-small cell lung cancer*, NSCLC) in stadio avanzato è una patologia estremamente eterogenea che necessita, alla diagnosi, di una accurata definizione istologica (soprattutto nella distinzione fra forme squamose e non squamose) e di un'adeguata caratterizzazione molecolare finalizzata alla migliore impostazione terapeutica. Le linee guida nazionali prevedono che il profilo molecolare comprenda l'analisi dell'espressione di PD-L1 per tutte le varianti istologiche e, per l'istologia non-squamosa, la ricerca di alterazioni a carico dei geni *driver* EGFR, ALK, ROS-1 e BRAF, la cui presenza codifica la malattia *oncogene-addicted*, passibile di trattamento personalizzato mediante l'impiego di molecole approvate dall'agenzia regolatoria del farmaco. Esistono poi bersagli molecolari aggiuntivi (fra cui KRAS, RET, MET, NTRK e altri), potenzialmente oggetto di

terapia mirata nell'ambito di studi clinici sperimentali, mediante applicazione della Legge 648/96 o grazie a programmi compassionevoli (*expanded access program*, EAP) attivi sul territorio nazionale.

La suddetta analisi molecolare è codificata per essere effettuata sul campione tissutale, necessario al contempo per la diagnosi morfologica. In aggiunta alla profilazione molecolare eseguita al momento della diagnosi, la stessa valutazione trova indicazione al momento della progressione per la ricerca di meccanismi di resistenza, a loro volta passibili di trattamenti specifici, sebbene al momento questa sequenza terapeutica di precisione trovi scarsa applicazione nella pratica clinica. Nonostante i progressi conseguiti con le tecniche di campionamento tissutale (agobiopsia percutanea trans-toracica *imaging-guided*, EBUS/TBNA, biopsia chirurgica in VATS e altre), queste restano caratterizzate da fattori limitanti: sono metodiche semi-invasive o invasive, operatore dipendente; espongono il paziente a potenziali complicanze procedurali; non sono universalmente eseguibili in ragione

Dipartimento di Oncologia, Università di Torino, A.O.U. San Luigi Gonzaga, Orbassano (TO)

alessandro.audisio@edu.unito.it

Revisori: Enrica Capelletto e Silvia Novello, Dipartimento di Oncologia, Università di Torino, A.O.U. San Luigi Gonzaga, Orbassano (TO)

di difficoltà tecniche e/o di controindicazioni correlate alle caratteristiche della malattia o del paziente; possono concludersi con il prelievo di una quantità esigua di materiale e/o di un campione di qualità sub-ottimale.

La **biopsia liquida**, ossia l'utilizzo di fluidi biologici corporei come surrogato del tessuto neoplastico prelevato *in situ*, rappresenta pertanto un'alternativa allettante alle tecniche tradizionali. Questo approccio è caratterizzato da invasività minima, basso costo nella sua mera esecuzione, è una metodica sicura e perciò facilmente ripetibile. Si tratta tuttavia di una metodica non ancora standardizzata a tutti gli effetti e, di conseguenza, non riproducibile su larga scala e/o rimborsabile in tutte le sue potenziali applicazioni. Tra le maggiori limitazioni vanno annoverate l'impossibilità di ricavarne un'indagine istologica, una sensibilità insoddisfacente in molti casi e la necessità di fare ricorso a una *expertise* specifica, a meno che non si pensi di centralizzare l'analisi in centri di riferimento.

Il principale tipo di approccio in uso è costituito dall'analisi del DNA tumorale circolante (*circulating tumor DNA*, **ctDNA**), sebbene sia possibile utilizzare altri derivati tumorali presenti nel sangue o in altri liquidi biologici, questi trovano attualmente spazio solo nell'ambito della ricerca (cellule tumorali circolanti, CTC, RNA circolante, esosomi). Il ctDNA rappresenta una frazione del DNA libero circolante (*cell-free DNA*, cfDNA) isolato dal plasma sanguigno, la cui quota è variabile a seconda del tipo di tumore, del carico di malattia, della localizzazione e dal tasso di proliferazione, essendo rilevabile nel 50-90% dei pazienti con patologia oncologica.¹

Il ctDNA può essere analizzato mediante metodiche di *polymerase chain re-*

action (PCR) o *next generation sequencing* (NGS). Le tecniche di PCR più precise, come la *real time ARMS PCR* (tecnica allele specifica) o alcuni i protocolli di *digital PCR* (per esempio ddPCR, BEAMing), permettono di analizzare mutazioni puntiformi o piccole inserzioni e delezioni. È tuttavia unicamente possibile l'analisi di un numero limitato di loci genici, seppur con una buona sensibilità e un'ottima specificità. Nell'ambito dell'oncologia toracica l'unica applicazione standardizzata a oggi in questo contesto è l'analisi della mutazione di EGFR T790M. Le tecniche di sequenziamento basate su NGS consentono invece di indagare sia un numero di geni limitato a specifici pannelli sia di estendere l'analisi all'intero genoma (*whole genome sequencing*) o all'intero esoma (*whole exome sequencing*). Il numero di geni analizzati è direttamente proporzionale ai costi, alle tempistiche e alle difficoltà di interpretazione dei risultati. L'NGS permette di rilevare uno spettro più ampio di mutazioni, inserzioni e delezioni e, seppur con sensibilità limitata, amplificazioni e riarrangiamenti.

Per un migliore inquadramento dell'attuale applicazione di queste metodiche sul territorio nazionale, illustriamo di seguito i due scenari possibili, che riguardano comunque la sola condizione di NSCLC in stadio avanzato con mutazione di EGFR.²

Il primo scenario, schematizzato in Figura 1, è rappresentato dal paziente affetto da NSCLC in stadio avanzato (a istologia non-squamosa e/o a ogni istologia se *never smoker*), *naïve* da terapie. Nel caso in cui il materiale tissutale non sia qualitativamente o quantitativamente adeguato per l'analisi mutazionale del gene EGFR si può ricorrere alla biopsia liquida per effettuare l'indagine, auspicando che questo avvenga in centri

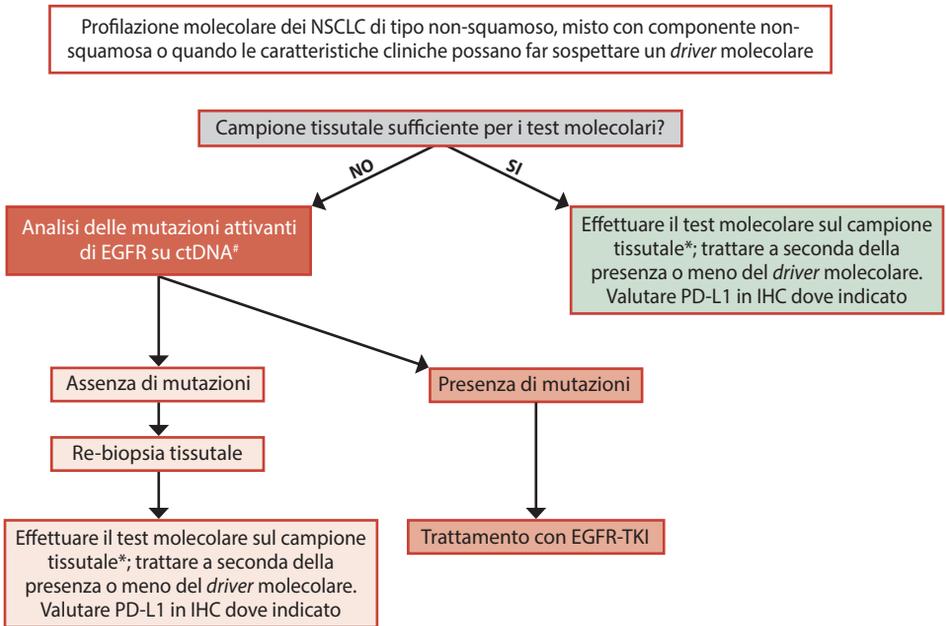


Figura 1. Paziente con NSCLC in stadio avanzato non pretrattato. # Analisi molecolari di altri geni su ctDNA esclusivamente in ambito di studi clinici. Mutazioni attivanti di EGFR: mutazioni puntiformi dell'esone 18, delezioni dell'esone 19, mutazioni puntiformi dell'esone 20 e 21. * Pannello raccomandato: mutazioni puntiformi dell'esone 18, delezioni dell'esone 19, mutazioni puntiformi dell'esone 20 e 21 del gene EGFR, mutazione p.V600E di BRAF, riarrangiamenti di ALK, ROS-1, RET, NTRK, amplificazione e mutazione exon 6 *skipping* di MET, amplificazione di HER2, mutazione p.G12C del gene KRAS.

altamente specializzati e qualificati per tale scopo. Il test eseguito su ctDNA è caratterizzato da una buona specificità (solitamente > 90%), seppur con una sensibilità che oscilla tra il 50% e l'80%.³ Un risultato positivo pone il paziente nella condizione di poter ricevere una terapia *targeted* con inibitore tirosin-kinasico di EGFR (EGFR-TKI), mentre un esito negativo pone il clinico nella condizione di dover valutare (o riconsiderare) l'approccio tissutale.

Altri impieghi della biopsia liquida al momento della diagnosi sono da ritenersi non routinari.

Il secondo scenario, schematizzato in Figura 2, è rappresentato dal paziente affetto da NSCLC in stadio avanzato e con mu-

tazione attivante di EGFR, in progressione a trattamento con EGFR-TKI di prima o seconda generazione (gefitinib, erlotinib, afatinib), quando sia indicata una rivalutazione dello stato molecolare del gene EGFR. Infatti, circa il 60% dei pazienti in questo *setting* sviluppa la mutazione di resistenza T790M,³ passibile di terapia con l'EGFR-TKI di nuova generazione (osimertinib). In considerazione di assenza di invasività (si tratta di un semplice prelievo ematico), costo limitato della procedura (ossia della parte preanalitica), rapidità di esecuzione, elevata specificità (oltre al 90%)⁴, elevata incidenza della mutazione e discreta sensibilità (compresa tra 40 e 90%)⁴ la biopsia liquida viene spesso im-

piegata in prima battuta. Tuttavia, nei casi con esito negativo su ctDNA, è auspicabile una re-biopsia tissutale, mentre un risultato positivo è dirimente per avviare la nuova terapia.

Anche in questo scenario, tale procedura non è una metodica approvata e rimborsata per l'identificazione di alterazioni molecolari di resistenza differenti dalla T790M, come altre mutazioni di EGFR o a carico di altri geni (per esempio MAPK, MET, HER2, ecc.) o per la trasformazione istologica a SCLC, presente in una percentuale non irrilevante di casi (fino al 14%),³ che richiedono pertanto un'analisi su campione tissutale e, a cascata, una gestione terapeutica radicalmente differente. La possibilità di impiego di osimertinib in prima linea di terapia renderà (e di fatto ha già reso) meno frequente questo scenario specifico.

Così come per l'analisi molecolare

su tessuto, anche per la biopsia liquida la scelta delle regioni genetiche da analizzare e la loro interpretazione richiedono una specializzazione crescente e la presenza di figure specialistiche dedicate e integrate, come sta già avvenendo in alcune realtà oncologiche con la formazione dei *Molecular Tumour Board*.

In linea teorica, l'ambito di ricerca con ricadute più immediate nella pratica clinica è quello che guarda all'utilizzo della biopsia liquida nell'analisi di mutazioni diverse da EGFR e già passibili di terapia specifica. Un esempio concreto è rappresentato dallo studio clinico di fase II VISION, in cui è stata valutata l'efficacia e la sicurezza di tepotinib nei pazienti con NSCLC in stadio avanzato con mutazione *exon skipping* 14 di MET. Nello studio la mutazione è stata analizzata tramite biopsia tissutale, liquida (NGS su ctDNA) o con entrambe. Lo stu-

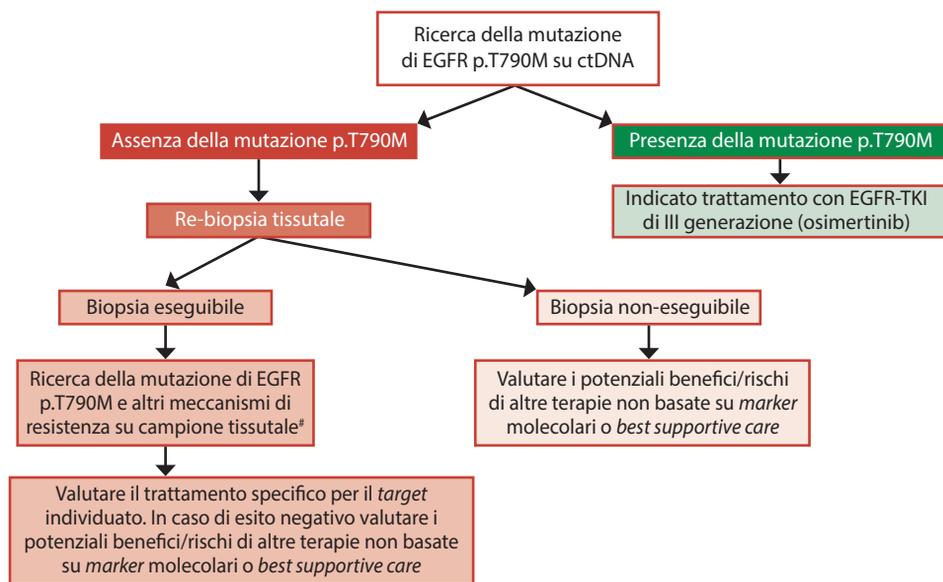


Figura 2. Paziente con NSCLC in stadio avanzato pretrattato con EGFR TKI di prima o seconda generazione. # Mutazioni acquisite di EGFR non-p.T790M (per esempio C797S), amplificazione di MET, amplificazione di HER2, mutazioni del *pathway* RAS-MAPK, amplificazione o mutazioni puntiformi di PI3K, *switch* istotipico a SCLC.

dio ha evidenziato un *response rate* pari al 50%, non significativamente differente per i soggetti la cui mutazione era stata valutata su campione tissutale, ctDNA o su entrambi (50% vs 48% vs 46%).⁵ Un altro esempio è rappresentato dallo studio BFAST, in cui la scelta terapeutica nella prima linea di trattamento viene dettata dall'esito della biopsia liquida analizzata con metodica NGS. Dei 119 pazienti (il 5,4% del totale di pazienti arruolati) affetti da NSCLC ALK traslocato, 87 sono stati trattati con alectinib con un'ORR dell'87,4%.⁶

Questi sono peraltro solo due esempi di come la ricerca clinica si stia muovendo in questo ambito. Sono poi in corso vari studi che valutano potenziali fattori predittivi di risposta all'immunoterapia. Un'analisi retrospettiva del 2018 di pazienti affetti da NSCLC in stadio avanzato⁷ ha evidenziato come sia possibile utilizzare il carico di mutazione tumorale (*tumor mutational burden*, TMB) valutato su plasma quale indicatore di risposta per la terapia con *immune checkpoint inhibitors*.

Se già in fase diagnostica molti sono gli spazi di sviluppo della biopsia liquida, certamente ancora più interessanti sono i suoi potenziali impieghi al momento della progressione di malattia quando la storia pregressa, le condizioni fisiche e psicologiche del paziente rendono spesso ancora più complesso l'approccio tissutale. In questo contesto, il monitoraggio della risposta alla terapia e l'identificazione precoce delle recidive tramite la ricerca seriatata delle cellule tumorali circolanti (CTCs) sarebbero di grande ausilio nell'impostazione di un più preciso algoritmo terapeutico.

In conclusione, la rapida evoluzione terapeutica in ambito oncologico, caratterizzata dall'introduzione di un numero consistente di nuove molecole, molte delle

quali a bersaglio molecolare, spesso non si accompagna a un'altrettanta rapida crescita delle possibilità di identificazione di marcatori predittivi (e/o di risposta e resistenza). È pertanto chiaro come, sebbene a oggi la biopsia liquida integri la biopsia tissutale e la sostituisca solamente in casi specifici e limitati, sia auspicabile che nel futuro vengano validate e approvate metodiche che permettano di sfruttarne appieno l'enorme potenziale. Solo la sua costante applicazione prospettica nell'ambito di studi clinici dedicati potrà meglio disegnarne il profilo e definirne il ruolo nell'*iter* diagnostico e terapeutico del tumore polmonare, che è diventato, negli ultimi anni, l'emblema della malattia oncologica passibile di medicina di precisione.

Bibliografia

- 1) BETTEGOWDA C, SAUSEN M, LEARY RJ, ET AL. *Detection of circulating tumor DNA in early-and late-stage human malignancies*. Sci Transl Med 2014;6:224ra24.
- 2) Associazione Italiana di Oncologia Medica (AIOM), Società Italiana di Anatomia Patologica e Citologia Diagnostica (SIAPEC-IAP), Società Italiana di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica (SIBioC), Società Italiana di Farmacologia (SIF). *Raccomandazioni 2020 per l'esecuzione di Test Molecolari su Biopsia Liquida in Oncologia*. Luglio 2020.
- 3) DIAO Z, HAN Y, ZHANG R, LI J. *Circulating tumour DNA: a new biomarker to monitor resistance in NSCLC patients treated with EGFR-TKIs*. BBA Rev Cancer 2020;1873:188363.
- 4) ROLFO C, MACK PC, SCAGLIOTTI GV, ET AL. *Liquid biopsy for advanced non-small cell lung cancer (NSCLC): a statement paper from the IASLC*. J Thorac Oncol 2018;13:1248-68.
- 5) PAIK PK, FELIP E, VEILLON R, ET AL. *Tepotinib in non-small-cell lung cancer with MET exon 14 skipping mutations*. N Engl J Med 2020;383:931-43.
- 6) GADGEEL SM, MOK TSK, PETERS S, ET AL. *Phase II/III blood first assay screening trial (BFAST) in patients (pts) with treatment-naïve NSCLC: initial results from the ALK+ cohort*. Ann Oncol 2019;30: v851-v934.
- 7) GANDARA DR, PAUL SM, KOWANETZ M, ET AL. *Blood-based tumor mutational burden as a predictor of clinical benefit in non-small-cell lung cancer patients treated with atezolizumab*. Nat Med 2018; 24:1441-8.