

ANALISI MOLECOLARI A SCOPO TERAPEUTICO DI PAZIENTI DELL'AREA DI BOLOGNA CON TUMORI SOLIDI

Sottotitolo scientifico: CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE AVANZATA DI TUMORI SOLIDI AVANZATI CONDIDATI AL TRATTAMENTO CON TERAPIE MIRATE INNOVATIVE

Andrea Ardizzoni, Michelangelo Fiorentino.

Dipartimento di Medicina Specialistica, Diagnostica e Sperimentale, Alma Mater Studiorum, Università di Bologna.

Il progetto ha avuto la durata di un anno e ha permesso lo sviluppo di una nuova metodica di caratterizzazione molecolare dei tumori solidi basata sulla tecnologia del Next Generation Sequencing (NGS). La tecnologia di sequenziamento NGS ad alta produttività permette di sequenziare frammenti multipli di DNA di multipli geni e multipli pazienti nella stessa corsa tramite un procedimento di bar-coding genetico. In particolare, per la caratterizzazione molecolare dei tumori la metodica NGS rende possibile sequenziare un elevato numero di ampliconi di oncogeni e geni onco-soppressori implicati nella trasformazione neoplastica e bersaglio di terapia oncologiche mirate. La metodologia NGS cambia completamente l'approccio laboratoristico alla caratterizzazione molecolare dei tumori. Infatti, ciò permette di passare da una strategia a singolo gene/test a una multi-gene/multi-test. Gli obiettivi finali del passaggio metodologico sono:

- Aumentare l'efficienza diagnostica dei test
- Rendere disponibile un numero di maggiore di geni/test a parità di costo e di tempo di esecuzione
- Determinare un complessivo risparmio economico sul costo per test

Il carcinoma polmonare è la neoplasia maligna con la più alta mortalità sia nel maschio sia nella femmina ed è la seconda neoplasia per frequenza nel maschio e la terza nella femmina. I tumori del polmone rappresentano uno dei principali costi sanitari in oncologia. Negli ultimi sono state sviluppate per i tumori del polmone numerose terapie mirate anti-tumorali dirette contro alterazioni molecolari specifiche delle cellule neoplastiche. A partire dal 2009 sono entrati in prontuario farmaceutico progressivamente farmaci anti EGFR, ALK, ROS1 dotati di evidente efficacia in pazienti giovani, non fumatori con tumori polmonari. Numerosi altri farmaci sono in fase di sperimentazione clinica diretti contro alterazioni dei geni BRAF, HER2, MET, RET, KRAS, NTRK sempre in pazienti con tumori polmonari. Per questo motivo i pazienti con tumori polmonari sono i candidati ideali per lo sviluppo di test molecolari multi-gene.

Il laboratorio di Patologia Molecolare del Policlinico S.Orsola Malpighi serve dal 2009 le esigenze di caratterizzazione molecolare dei pazienti della città di Bologna e di Imola e lavora in stretto contatto con i Servizi di Oncologia Medica dell'Area Metropolitana di Bologna.

L'obiettivo principale del progetto è stato fornire ai pazienti dell'Area di Bologna uno strumento diagnostico basato su tecnologia NGS multi-gene, sostituendo i precedenti metodi basati su test a singolo gene. Per testare la nuova tecnologia è stato scelto di cominciare da pazienti con tumori polmonari avanzati eseguendo in doppio cieco i test con la metodica a singolo gene e multi-gene.

A fine di raggiungere l'obiettivo del progetto è stata implementata una metodica di sequenziamento massivo parallelo NGS con un pannello genico in grado di fornire allo stesso tempo informazioni riguardo a mutazioni, fusioni e variazioni del numero di copie di oltre 50 geni coinvolti nella terapia

mirata dei tumori solidi. Per l'espletazione della metodica è stato utilizzato in una prima fase un sequenziatore NGS Ion Torrent PGM e in seguito un sequenziatore Ion Torrent S5 entrambi acquisiti dall'Azienda Ospedaliero-Universitaria Policlinico S.Orsola-Malpighi per il proprio Laboratorio di Patologia Molecolare Oncologica

In una prima fase del progetto si è proceduto alla ottimizzazione della metodica di NGS per analisi mutazionale ad ampio spettro sul sequenziatore PGM Ion Torrent con saggi solo mutazionali o per fusioni geniche (Oncomine Solid Tumor DNA e Ion AmpliSeq Cancer Hotspot Panel) su 14 pazienti con tumori polmonari e con profilo mutazionale noto. Una volta ottenuta una concordanza >95% dei dati ottenuti con la metodica NGS si è proceduto a ottimizzare il test Oncomine Focus 318 Assay in grado di valutare contemporaneamente mutazioni, fusioni e variazioni del numero di copie di 52 geni.

Nella seconda fase del progetto si è proceduto all'arruolamento di 147 pazienti con tumori del polmone in stadio avanzato afferenti al nostro servizio di Oncologia Medica dall'area metropolitana di Bologna, sui quali è stato applicato il test Oncomine Focus 318 Assay. Sono stati arruolati solo pazienti i cui campioni mostravano almeno 50% di arricchimento in cellule neoplastiche e da cui erano stati estratti almeno 20 ng di DNA e 50 ng di RNA. In questi pazienti è stata valutata tramite analisi bioinformatica la tipologia di varianti genetiche somatiche riscontrate e l'appropriatezza dell'applicazione di queste varianti per l'uso di terapie oncologiche personalizzate.

Il test Oncomine Focus 318 Assay ha permesso di rilevare mutazioni aggiuntive non evidenti allo screening mutazionale di routine in 48/147 pazienti (33%). In 6/147 pazienti (4%) la variante riscontrata con l'analisi NGS, e non rilevata alle precedenti analisi, ha garantito l'uso di un farmaco a bersaglio già approvato per l'uso clinico (2 fusione di ROS1 e 4 mutazioni di EGFR). In 19 su 147 pazienti (13%) l'analisi NGS ha mostrato la presenza di varianti bersaglio di farmaci in fase di sperimentazione (geni BRAF, HER2, MET, FGFR1, RET). In 15/147 pazienti (10%) sono state riscontrate varianti associate a possibile resistenza a farmaci target o a chemioterapia (mutazioni di KRAS, amplificazioni di EGFR e MYC). In 8 su 147 pazienti (5%) sono state riscontrate varianti al momento non identificabili né come bersaglio di terapie mirate né come fattori di resistenza (mutazioni di HRAS, PI3KCA, MAPK, AKT e CKIT).

Sulla base di questi risultati e grazie alla valutazione con il test NGS sviluppato all'interno del progetto sei pazienti dell'area di Bologna con tumore polmonare avanzato hanno avuto accesso a terapie oncologiche mirate per varianti non identificate durante i test di routine. Diciannove pazienti hanno avuto la potenzialità di accedere a protocolli terapeutici sperimentali.

L'attuazione del progetto ha permesso di validare e introdurre la metodica del pannello NGS nella routine diagnostica del laboratorio di patologia molecolare oncologica dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Bologna in sostituzione di metodologie a singolo test più costose e più laboriose.

Nella terza fase del progetto di implementazione prospettica del test NGS che è cominciata a Gennaio 2019 si è proceduto alla sostituzione delle metodiche a singolo gene con la metodica NGS multi-gene.

Nel corso dell'anno 2019 sono stati testati grazie al test validato con il progetto 455 pazienti con tumori polmonari dell'area di Bologna. In 76 di questi pazienti (17%) è stato possibile identificare alterazioni molecolari potenzialmente eleggibili per terapie avanzate con farmaci innovativi a bersaglio molecolare nell'ambito di studi clinici o programmi di accesso allargato o usi "off-label".

Breve riassunto divulgativo:

La terapia oncologica dei tumori solidi avanzati è cambiata radicalmente negli ultimi 10 anni.

Il progetto ha centrato l'obiettivo di aumentare l'offerta standard di test molecolari per la caratterizzazione tumorale, al di là dei limiti imposti dai rimborsi del SSN, effettuando un sequenziamento completo e profondo del DNA tumorale utilizzando nuove metodologie ad alto rendimento (Next Generation Sequencing). Questa pre-selezione molecolare di base, eseguita su una piccola parte del materiale biologico diagnostico, ha permesso di ottimizzare l'uso del materiale biologico disponibile evitando ai nostri pazienti l'esecuzione di ulteriori prelievi invasivi e cercando di non perdere alcuna possibilità, per quanto remota, di accesso a trattamenti farmacologici mirati potenzialmente salvavita.

Il progetto ha consolidato la connessione tra l'Oncologia Medica, la Patologia Molecolare e l'Endoscopia Interventistica nell'ambito del PDTA per i tumori del polmone dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Bologna

Il progetto ha permesso di introdurre nella pratica clinica il test NGS per i pazienti con tumori polmonari avanzati. Inoltre, durante lo svolgimento del progetto e grazie al finanziamento della Fondazione è stato possibile formare a pieno una giovane laureata in tecniche di laboratorio biomedico all'uso del sequenziatore NGS, studentessa che poi è stata assunta recentemente presso i laboratori di anatomia patologica della AUSL di Bologna.