

Raccomandazioni 2020 sui Farmaci Agnostici

A cura del Gruppo di Lavoro AIOM – SIAPEC-IAP – SIBIOC – SIF



Società Italiana di Anatomia Patologica
e Citologia Diagnostica - Divisione Italiana
della International Academy of Pathology



SOCIETÀ ITALIANA
DI FARMACOLOGIA

Giordano Beretta, Ettore Capoluongo, Rita Chiari, Laura Cortesi, Romano Danesi, Marzia Del Re, Ada Florena, Gabriella Fontanini, Stefania Gori, Lorena Incorvaia, Umberto Malapelle, Antonio Marchetti, Dario Sangiolo, Nicola Silvestris, Pierosandro Tagliaferri, Giovanni Tallini, Bruno Vincenzi e Antonio Russo.

Settembre 2020



Sommario

- 1. Introduzione: dall'Oncologia Mutazionale ai Farmaci "Agnostici"*
- 2. Immunoterapia nei Tumori "mismatch repair (MMR)-deficient"*
 - 2.1. MMR deficiency nei tumori e risposta all'immunoterapia*
 - 2.2. Determinazione del MMR status e tecnologie a disposizione*
 - 2.3. Approvazione agnostica di Immune-checkpoint Inibitori e attuali indicazioni terapeutiche*
- 3. Inibitori di "Tropomyosin Receptor Kinase (TRK)"*
 - 3.1. "TRK fusion" nei tumori solidi*
 - 3.2. Tecniche diagnostiche disponibili*
 - 3.3. Approvazione agnostica dei TRK-inibitori e attuali indicazioni terapeutiche*
- 4. Tumori con deficit dei meccanismi di riparazione attraverso ricombinazione omologa*
- 5. Altri marcatori agnostici e comprehensive genomic profiling*
- 6. Nuove tecnologie*
- 7. Implementazione dei Molecular Tumor Board (MTB) e aspetti regolatori*

1. Introduzione: dall'Oncologia Mutazionale ai Farmaci "Agnostici"

Il recente sviluppo di nuove tecnologie quali il sequenziamento di seconda generazione, *next generation sequencing* (NGS), e i numerosi progressi nel campo della genomica hanno consentito una continua e ulteriore evoluzione della "oncologia di precisione". Il nuovo paradigma dell'"oncologia mutazionale", pur integrandosi e riconoscendo il valore del dato morfologico e istologico, ha avviato l'era dei test di profilazione genomica, della scelta del farmaco antitumorale sulla base della mutazione "driver" e della approvazione agnostica, ovvero l'indicazione terapeutica indipendentemente dalla sede del tumore.

Questo nuovo modello, tuttavia, nonostante abbia la potenzialità di rivoluzionare lo scenario terapeutico dell'oncologia, presenta alcune criticità. Innanzitutto i dati scientifici sono ancora preliminari; in seconda istanza, è estremamente complesso, e richiede pertanto una *governance* che garantisca che nel *real world* venga sempre mantenuta l'appropriatezza, l'omogeneità e la sostenibilità economica dei test genomici richiesti; infine, richiede specifiche competenze scientifiche e cliniche nella scelta delle terapie mediche. Tali competenze vanno garantite attraverso la formazione delle figure professionali coinvolte nel processo decisionale e l'implementazione di *Molecular Tumor Board* (MTB), ovvero gruppi multidisciplinari impegnati nella comprensione dei test genomici e nella scelta dei farmaci tra le opzioni terapeutiche disponibili.


Sulla base di tali premesse questo documento, condiviso dai rappresentanti di diverse società scientifiche, ha l'obiettivo di fornire delle raccomandazioni su alcuni aspetti ritenuti importanti relativamente all'impiego dei test genomici, alle indicazioni attuali dei farmaci "agnostici" e alla gestione degli aspetti organizzativi e regolatori.

2. Immunoterapia nei Tumori "Mismatch repair (MMR)-deficient"

2.1 MMR deficiency nei tumori e risposta all'immunoterapia

Razionale del dMMR/MSI-H come biomarcatore predittivo di risposta all'immunoterapia

Negli ultimi anni, l'immunoterapia è diventata un nuovo paradigma terapeutico nel trattamento antitumorale, portando a risposte di lunga durata per molti comuni tumori solidi (1-6). Tuttavia, l'applicazione clinica dei trattamenti immunoterapici è limitata perché in alcuni tumori l'efficacia è limitata con bassi tassi di risposta (1,2). Pertanto, l'utilizzo di biomarcatori diventa necessario per distinguere i pazienti sensibili, e prevedere la risposta terapeutica. In letteratura esistono ampie prove a sostegno di biomarcatori predittivi di risposta, tra cui: l'espressione del recettore o del suo ligando di morte programmato 1 (PD-1/PD-L1), il carico mutazionale del tumore (TMB), il numero di linfociti infiltranti il tumore (TIL), la conta dei linfociti nel sangue periferico, il deficit di riparazione (dMMR) e l'alta instabilità dei microsatelliti (MSI-H) (3). Tra i vari biomarcatori, dMMR e MSI-H mostrano vantaggi unici. Tumori con alti livelli di dMMR o MSI-H sembrerebbero essere sensibili all'immunoterapia. Inoltre, l'alto grado di dMMR o MSI-H sembrerebbe essere in grado di identificare i *responder* indipendentemente dalla sede e dal tipo di



tumore. Per tale motivo, la *Food and Drug Administration* (FDA) ha approvato l'indicazione dell'immunoterapia per tutti i tumori solidi con dMMR/MSI-H (4).

Il sistema del *mismatch repair* (MMR) gioca ruoli chiave nell'identificazione a livello cellulare e nella riparazione di nucleotidi non corrispondenti durante la ricombinazione genetica o come conseguenza di danni causati da insulti fisici o chimici esterni, garantendo integrità e stabilità genomica. Il sistema MMR comprende una serie di specifici enzimi di riparazione del DNA ed è, di solito, dipendente da quattro geni chiave: *MLH1*, *PMS2*, *MSH2* e *MSH6*. L'assenza di riparazione dei danni al DNA causa una maggior incidenza di eventi mutazionali, che aumentano il numero di generare neoantigeni a livello tumorale, attivando la risposta immunitaria.

Inoltre, i tumori con dMMR hanno una densa infiltrazione di CD8 + TIL, che inducono una risposta migliore e più duratura con l'immunoterapia (5).

Il deficit di MMR può essere il risultato di mutazioni germinali o alterazioni spontanee di ipermutazione, che possono indurre instabilità dei microsatelliti (MSI). Due ripetizioni mononucleotidiche (BAT25 e BAT26) e tre ripetizioni di dinucleotidi (D5S346, D2S123 e D17S250) sono i siti standard in pannelli per i test MSI, come raccomandato dal *National Cancer Institute* nel 1998 (6-8). Se due o più delle ripetizioni sono alterate, il tumore è definito come MSI-H; se viene trovata solo una sequenza mutata, viene considerato il tumore a bassa instabilità dei microsatelliti (MSI-L). Altrimenti, si dice che il tumore abbia stabilità nei microsatelliti (MSS). C'è un alto livello di concordanza (quasi 90–95%) tra dMMR e MSI-H in diversi tumori; pertanto, questi due biomarcatori sono usati quasi in modo intercambiabile (9).

Approvazioni dei farmaci per tumori agnostici


La prima approvazione agnostica è avvenuta nel 2017, quando la FDA ha concesso un'approvazione accelerata per l'utilizzo del pembrolizumab in pazienti adulti e pediatrici con tumori solidi metastatici con dMMR/MSI-H, progrediti dopo un precedente trattamento e privi di opzioni terapeutiche alternative soddisfacenti; e in pazienti con carcinoma del colon-retto MSI-H o dMMR progredito a seguito del trattamento con fluoropirimidina, oxaliplatino ed irinotecano.

L'approvazione si basava sui dati di 149 pazienti con tumori MSI-H o dMMR arruolati in cinque studi clinici randomizzati, multi-coorte, multicentrici, a singolo braccio. Novanta pazienti avevano un carcinoma del colon-retto e 59 pazienti avevano diversi tipi di tumore (14 in totale). Ai pazienti è stato somministrato pembrolizumab, 200 mg ogni 3 settimane, o pembrolizumab, 10 mg/kg ogni 2 settimane. Il trattamento è continuato fino a tossicità o progressione della malattia.

L'ORR è stato del 39,6% (IC al 95%: 31,7, 47,9); la durata di risposta è stata uguale o superiore ai 6 mesi per il 78% dei pazienti. Vi sono state 11 risposte complete e 48 risposte parziali.

Anche l'efficacia di nivolumab è stata studiata in pazienti con tumori dMMR/MSI-H, e, nel 2017, la FDA ha concesso l'approvazione accelerata per nivolumab per il trattamento di pazienti dMMR/MSI-H con carcinoma coloretale metastatico, progrediti al trattamento con chemioterapia standard a base di fluoropirimidine, oxaliplatino ed irinotecano.

L'approvazione si è basata sui dati dello studio CA209142 (CHECKMATE 142; NCT 02060188), uno studio multicentrico, in aperto, a singolo braccio condotto in 53 pazienti con carcinoma del colon-retto metastatico con dMMR o MSI-H progrediti alla chemioterapia standard. Tutti i pazienti



hanno ricevuto nivolumab 3 mg/kg per infusione endovenosa ogni 2 settimane fino a tossicità inaccettabile o progressione radiografica.

Il tasso di risposta obiettiva (ORR) è stato del 28% (IC 95%: 17, 42). Il 67% (IC 95%: 38, 88) dei pazienti ha ottenuto risposte della durata uguale o superiore a 6 mesi, con 1 risposta completa e 14 risposte parziali; le percentuali di PFS e OS a 12 mesi erano del 50% e il 73%, rispettivamente (10). Inoltre, lo status di dMMR/MSI-H si è dimostrato essere anche un utile biomarcatore per l'efficacia delle combinazioni di immunoterapici.

Nel 2018, la FDA ha concesso l'approvazione accelerata di ipilimumab per l'uso in combinazione con nivolumab per il trattamento di pazienti di età pari o superiore a 12 anni affetti da tumore del colon-retto metastatico con MSI-H o dMMR progredito al trattamento con fluoropirimidine, oxaliplatino ed irinotecano.

L'approvazione seguiva i dati dello studio già menzionato CA209142 (CHECKMATE 142; NCT02060188), è prevedeva uno studio multicentrico, non randomizzato, a più coorti paralleli, in aperto, che ha arruolato 82 pazienti con dMMR o MSI-H mCRC a chemioterapia standard. Tutti i pazienti hanno ricevuto ipilimumab 1 mg/kg per infusione endovenosa (IV) e nivolumab 3 mg/kg EV ogni 3 settimane per 4 dosi, seguito da nivolumab 3 mg/kg EV come agente singolo ogni 2 settimane, fino a tossicità inaccettabile o progressione radiografica (11).

Tra questi 82 pazienti, il tasso di risposta globale (ORR) è stato del 46% (IC 95%: 35,58), con 3 risposte complete e 35 risposte parziali e l'89% dei pazienti che hanno risposto ha avuto una durata di risposta di ≥ 6 mesi. L'ORR era superiore a quello osservato in una coorte separata di 58 pazienti con mCRC dMMR/MSI-H con progressione a chemioterapia che avevano ricevuto nivolumab da solo, con un ORR del 28% con 67% con durate di risposta ≥ 6 mesi (11).

Bibliografia

1. Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, Crino L, Eberhardt WE, Poddubskaya E, Antonia S, Pluzanski A, Vokes EE, Holgado E, Waterhouse D, Ready N, Gainor J, Aren Frontera O, Havel L, Steins M, Garassino MC, Aerts JG, Domine M, Paz-Ares L, Reck M, Baudelet C, Harbison CT, Lestini B, Spigel DR (2015) Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 373 (2):123-135. doi:10.1056/NEJMoa1504627
2. Robert C, Thomas L, Bondarenko I, O'Day S, Weber J, Garbe C, Lebbe C, Baurain JF, Testori A, Grob JJ, Davidson N, Richards J, Maio M, Hauschild A, Miller WH, Jr., Gascon P, Lotem M, Harmankaya K, Ibrahim R, Francis S, Chen TT, Humphrey R, Hoos A, Wolchok JD (2011) Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N Engl J Med* 364 (26):2517-2526. doi:10.1056/NEJMoa1104621
3. Yi M, Jiao D, Xu H, Liu Q, Zhao W, Han X, Wu K (2018) Biomarkers for predicting efficacy of PD-1/PD-L1 inhibitors. *Mol Cancer* 17 (1):129. doi:10.1186/s12943-018-0864-3
4. Lemery S, Keegan P, Pazdur R (2017) First FDA Approval Agnostic of Cancer Site - When a Biomarker Defines the Indication. *N Engl J Med* 377 (15):1409-1412. doi:10.1056/NEJMp1709968
5. Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, Skora AD, Luber BS, Azad NS, Laheru D, Biedrzycki B, Donehower RC, Zaheer A, Fisher GA, Crocenzi TS, Lee JJ, Duffy SM, Goldberg RM, de la Chapelle A, Koshiji M, Bhajee F, Huebner T, Hruban RH, Wood LD, Cuka N, Pardoll DM, Papadopoulos N, Kinzler KW, Zhou S, Cornish TC, Taube JM, Anders RA, Eshleman JR, Vogelstein B, Diaz LA, Jr. (2015) PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med* 372 (26):2509-2520. doi:10.1056/NEJMoa1500596
6. Boland CR, Goel A (2010) Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology* 138 (6):2073-2087 e2073. doi:10.1053/j.gastro.2009.12.064


7. Lynch HT, de la Chapelle A (2003) Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med* 348 (10):919-932. doi:10.1056/NEJMra012242
8. Yamamoto H, Imai K, Perucho M (2002) Gastrointestinal cancer of the microsatellite mutator phenotype pathway. *J Gastroenterol* 37 (3):153-163. doi:10.1007/s005350200015
9. Cicek MS, Lindor NM, Gallinger S, Bapat B, Hopper JL, Jenkins MA, Young J, Buchanan D, Walsh MD, Le Marchand L, Burnett T, Newcomb PA, Grady WM, Haile RW, Casey G, Plummer SJ, Krumroy LA, Baron JA, Thibodeau SN (2011) Quality assessment and correlation of microsatellite instability and immunohistochemical markers among population- and clinic-based colorectal tumors results from the Colon Cancer Family Registry. *J Mol Diagn* 13 (3):271-281. doi:10.1016/j.jmoldx.2010.12.004
10. Overman MJ, McDermott R, Leach JL, Lonardi S, Lenz HJ, Morse MA, Desai J, Hill A, Axelson M, Moss RA, Goldberg MV, Cao ZA, Ledeine JM, Maglinte GA, Kopetz S, Andre T (2017) Nivolumab in patients with metastatic DNA mismatch repair-deficient or microsatellite instability-high colorectal cancer (CheckMate 142): an open-label, multicentre, phase 2 study. *Lancet Oncol* 18 (9):1182-1191. doi:10.1016/S1470-2045(17)30422-9
11. Correction to *Lancet Oncol* 2017; 18: 1182-91 (2017). *Lancet Oncol* 18 (9):510. doi:10.1016/S1470-2045(17)30638-1

2.2 Determinazione del MMR status e tecnologie a disposizione

Come discusso precedentemente, il deficit di funzionalità del sistema di riparazione del DNA, e la sua conseguente caratteristica molecolare di instabilità microsatellitare definiscono il fenotipo molecolare di un gruppo di tumori caratterizzati da un alto carico mutazionale e potenzialmente responsivi a farmaci immunoterapici.

I microsatelliti definiti anche come *short tandem repeats* (STR) o *Simple Sequence Repeat* (SSRs), sono brevi sequenze ripetute di 1-6 nucleotidi che mappano sia all'interno delle regioni non codificanti che nelle regioni fiancheggianti gli introni-esoni. Esse sono distribuite nel genoma umano e disposte in tandem, e sono particolarmente inclini ad accumulare errori durante la replicazione del DNA. Nelle cellule normali, il sistema di riparazione di tali errori (MMR) è costituito da quattro proteine principali chiamate MLH1 (*MutL Homolog 1*), MSH2 (*MutS Homolog 2*), MSH6 (*MutS Homolog 6*) e PMS2 (*PostMeiotic Segregation increased 2*) che sono deputate al riconoscimento e correzione degli errori causati dalla DNA polimerasi durante la replicazione del DNA. Tuttavia, a causa della mancanza di geni MMR nelle cellule tumorali o presenza di difetti nel processo della riparazione del DNA al momento della sua replicazione, la possibilità di mutazione genica aumenta. In particolare, varianti deleterie germinali e/o somatiche a carico di *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2* comportano il mancato funzionamento e inattivazione del sistema MMR con un conseguente accumulo di alto tasso di mutazioni, in particolare a carico dei microsatelliti, la cui alterazione è rilevabile come "instabilità" (*microsatellite instability* o MSI) (1, 2). Pertanto, l'instabilità dei microsatelliti (MSI) rappresenta il fenotipo molecolare del deficit di funzionalità del sistema di riparazione del DNA (3).

L'instabilità dei microsatelliti viene acquisita in circa il 15% dei carcinomi del colon-retto, sia nelle forme sporadiche (80% circa dei casi) che in quelle ereditarie (sindrome del carcinoma ereditario non poliposico - HNPCC o sindrome di Lynch, il restante 20% circa) (4). Nelle forme sporadiche l'instabilità microsatellitare è quasi sempre legata alla perdita di espressione di *MLH1* causata dall'ipermetilazione del promotore del gene, mentre nella sindrome di Lynch lo stato



dMMR/MSI-H è costitutivo e legato a varianti patogenetiche (VP) germinali di uno dei geni codificanti il sistema MMR (5). dMMR/MSI-H ha valore sia predittivo che prognostico soprattutto nel caso del carcinoma colo-rettale, ma è presente anche in diversi altri tipi di tumori, tra cui carcinomi gastrico, endometriale, ovarico, transizionali, delle vie epatobiliari, della corteccia surrenale (6). I criteri e le metodiche per diagnosticare l'instabilità microsatellitare in un dato tumore sono mutuati da quanto definito per l'analisi dMMR/MSI-H nel carcinoma colo-rettale (7).

Test per la determinazione dell'instabilità microsatellitare e del sistema di MMR

Lo stato di instabilità microsatellitare può essere definito attraverso due principali metodiche: (I) test molecolari di analisi MSI effettuati su DNA estratto da cellule neoplastiche; (II) valutazione dell'espressione immunoistochimica (IIC) delle proteine del sistema di MMR su sezioni di tessuto neoplastico fissato in formalina e incluso in paraffina (FFPE).

Analisi dell'instabilità microsatellitare mediante metodiche basate su DNA

Il test di instabilità microsatellitare viene eseguito su DNA estratto da tessuto neoplastico in un'area con adeguata cellularità tumorale (>20%), valutata dal patologo, al fine di evitare risultati falsi negativi (8). La maggior parte delle tecniche di analisi di MSI è basata sull'amplificazione simultanea di cinque o più marcatori mediante multiplex PCR. I prodotti di PCR vengono poi analizzati mediante elettroforesi capillare che consente la distribuzione di tutti i marcatori in base alla loro lunghezza (“*Fragment length analysis*”) durante la corsa elettroforetica. Il profilo elettroforetico (Figura 1) mostra una serie di “picchi”, che corrispondono a ciascun marcatore analizzato. Ciascun picco viene confrontato con quello ottenuto dal tessuto di riferimento (non neoplastico) dello stesso paziente o, qualora disponibile, con quello atteso per la popolazione generale (9). Un tumore è caratterizzato da instabilità microsatellitare (MSI) quando la lunghezza di un marcatore differisce significativamente da quella presente nel tessuto di riferimento o da quella attesa nella popolazione generale; diversamente un tumore viene definito stabile (*microsatellite stable* – MSS).

Il primo pannello di riferimento per analisi di MSI (pannello Bethesda) consiste in tutto nell'analisi di cinque loci: due mononucleotidici (*BAT-25* e *BAT-26*) e tre dinucleotidici (*D2S123*, *D5S346* e *D17S250*) (9). Poiché i microsatelliti dinucleotidici sono meno sensibili rispetto a quelli mononucleotidici per l'indagine di MSI, è necessario un confronto con DNA estratto da tessuto di riferimento (non neoplastico). Usando il pannello Bethesda, tumori con instabilità in due o più di queste ripetizioni sono definiti ad alta instabilità (MSI-H); quelli con una ripetizione instabile sono detti a bassa instabilità (MSI-L); tumori senza alterazioni sono stabili (MSS).

Uno dei pannelli più utilizzato è il pannello Pentaplex, che rappresenta il nuovo standard di riferimento nella maggior parte dei protocolli per diagnosi di MSI (10, 11). Al contrario del Bethesda, Pentaplex non richiede il confronto con tessuto di riferimento (11), poiché vengono analizzati cinque loci mononucleotidici (*BAT-25*, *BAT-26*, *NR-21*, *NR-24* e *NR-27*). Un tumore è considerato MSI quando almeno tre loci risultano instabili; al contrario tumori con nessuno o un

locus instabile vengono considerati MSS. Quando invece si osservano due loci instabili, è richiesta un'ulteriore analisi comparativa con tessuto di riferimento non neoplastico.

Ad oggi esistono diversi kit commerciali (es. *TrueMark MSI Assay*, *ThermoFisher Scientific*; *GENEQUALITY CC-MSI*, *AB Analitica*) o test validati in laboratorio a fini diagnostici per l'analisi di MSI che a differenza del pannello Bethesda o Pentaplex consentono l'analisi simultanea di un numero maggiore di 5 loci, migliorando sensibilità e specificità nell'identificazione dell'instabilità microsatellitare (12).

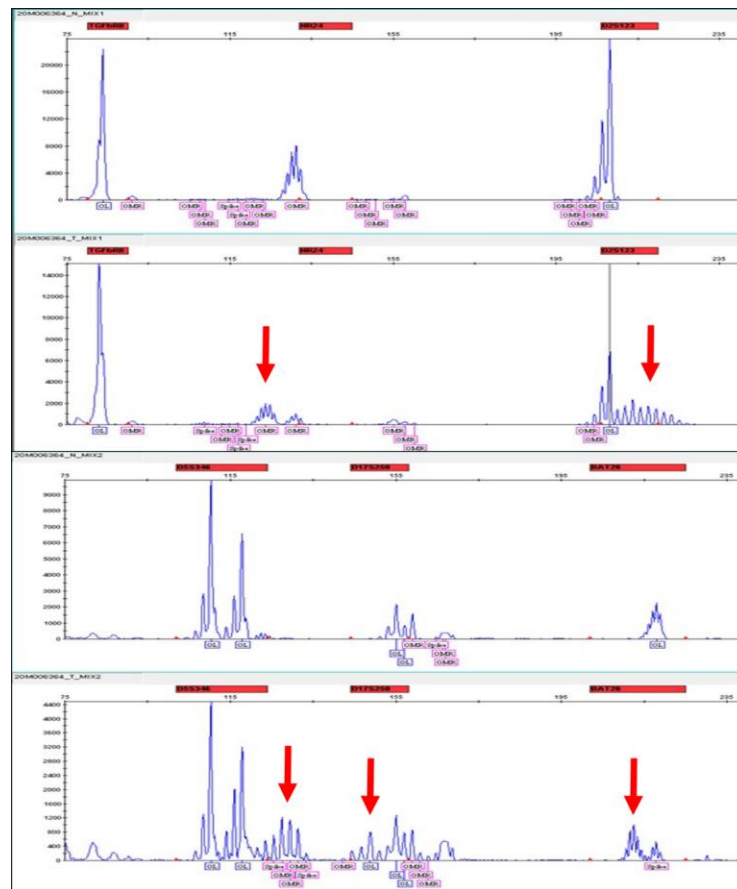


Figura 1: Profilo elettroforetico ottenuto utilizzando il kit GENEQUALITY CC-MSI (AB Analitica). Campione di carcinoma colorettales MSI-High. Le frecce rosse indicano i picchi relativi ai loci instabili.

Utilizzando tali pannelli più ampi, il tumore si considera MSS quando nessun locus (0%) risulta instabile; quando il numero di loci instabili è inferiore al 30% la neoplasia si considera MSI-L; quando il numero di loci instabili è maggiore del 30% il tumore si considera MSI-H. Le percentuali di cut-off tra MSI-L e MSI-H possono variare a seconda delle metodiche utilizzate. Nella maggior parte dei casi instabili la grande maggioranza dei loci analizzati è alterata e i casi MSI-L sono relativamente rari (12).

Un dato interessante è che alcuni studi hanno evidenziato come lo spettro di mutazioni abbia punti in comune nei pazienti con tumori MSI-H. Ad esempio, le mutazioni germinali del gene *POLE*

(polymerase ϵ)/*POLD1* (la DNA polimerasi δ umana) sono più comuni in pazienti con tumori MSI-H rispetto a pazienti con tumori MSS.

Oltre a quelli che utilizzano la tradizionale elettroforesi capillare sono ad oggi disponibili test basati su metodiche alternative quali Real-Time PCR (ad es. *EasyPGX ready MSI*, *Diatech Pharmacogenetics*) o elettroforesi microfluidica automatizzata (13).

Analisi dell'instabilità microsatellitare mediante valutazione immunoistochimica del sistema di MMR

L'immunoistochimica è una tecnica che permette la valutazione dell'espressione delle proteine direttamente in sezioni di tessuto fissato in formalina e incluso in paraffina (FFPE). Le proteine MMR (MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2) sono normalmente espresse a livello del nucleo delle cellule. La perdita di espressione delle proteine MMR è definita dall'assenza di immunocolorazione nucleare delle cellule tumorali, mentre le cellule normali risultano positive. La presenza di colorazione nucleare in cellule non cancerose è necessaria come controllo interno positivo per definire l'adeguatezza del materiale esaminato. La perdita di espressione della proteina MMR è correlata ad un'alterazione genomica (perdita di eterozigosi, mutazioni o modificazioni epigenetiche) del gene corrispondente.

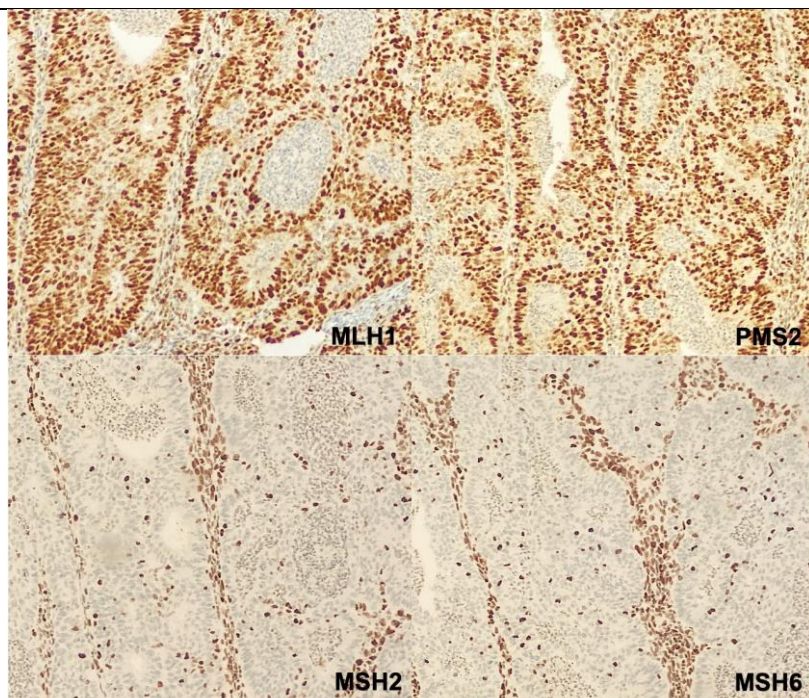



Figura 2: Determinazione immunoistochimica dell'espressione delle proteine del sistema di MMR: carcinoma endometriale con perdita di espressione di MSH2 e MSH6 ed espressione nucleare di MLH1 e PMS2.

Se l'espressione di almeno una di queste quattro proteine MMR risulta assente, significa che MMR è carente (dMMR) (Figura 2). Se tutte e quattro le proteine MMR sono espresse, significa che è funzionale (*Proficient Mismatch Repair*; pMMR). La funzionalità del sistema MMR è basata sull'interazione di eterodimeri: MLH1 è il partner di PMS2, mentre MSH2 è il partner di MSH6.



Nella loro forma monomeriche, le proteine MMR vengono degradate. Di conseguenza, la perdita di una proteina MMR è solitamente accompagnata dalla perdita del suo partner. Per esempio, a seguito della perdita delle proteine MLH1 o MSH2, le rispettive proteine partner (PMS2 e MSH6) rimangono in forma monomeriche, e saranno quindi rapidamente degradate. Di conseguenza, la perdita dell'espressione MLH1 è associata alla perdita di PMS2 e la perdita dell'espressione MSH2 è associata alla perdita di MSH6. Tuttavia, non è vero il contrario, in quanto le proteine MLH1 e MSH2, nelle loro forme monomeriche, possono interagire con altre proteine del sistema MMR evitando così la loro degradazione (14). La perdita isolata dell'espressione PMS2 ($\approx 5\%$ - 10% di dMMR nel carcinoma del colon-retto [CRC]) o la perdita isolata dell'espressione MSH6 ($\approx 5\%$ - 15% di dMMR CRC) non è rara. Per questa ragione la maggior parte delle linee guida propone di eseguire la valutazione dell'espressione immunohistochimica di tutte e quattro le proteine MMR (7).

Analisi dell'instabilità microsatellitare mediante DNA *versus* valutazione immunohistochimica del sistema di MMR

Il vantaggio dell'approccio basato sull'analisi del DNA consiste nella possibilità di identificare direttamente il fenotipo molecolare, indipendentemente dall'espressione delle proteine MMR alterate. Esistono infatti alcune mutazioni puntiformi inattivanti la proteina che ne mantengono l'espressione immunohistochimica (pattern di espressione nucleare normale, conservato), ma che ne alterano la funzione (fenotipo molecolare alterato, MSI). I test molecolari hanno oggi costi e tempistiche di poco superiori rispetto all'IIC. Le principali limitazioni dell'analisi basata su DNA sono: (i) l'impossibilità di identificare la proteina alterata, pertanto l'indagine immunohistochimica è utile per identificare lo specifico gene MMR alterato da sottoporre ad analisi di sequenza per la diagnosi genetica di sindrome di Lynch; (ii) la limitata sensibilità analitica: la diagnosi è poco affidabile in campioni con scarso arricchimento tumorale cioè campioni in cui le cellule neoplastiche rappresentano meno del 20% della cellularità totale (15, 16). In casi con scarso arricchimento tumorale la valutazione IIC può essere considerata più affidabile. Una importante limitazione dell'IIC per le proteine MMR nella diagnostica di routine è legata alla necessità di tessuto adeguatamente fissato in formalina, senza artefatti pre-analitici che possano comprometterne l'interpretazione del risultato (17).

Nuove Metodologie per analisi dei microsatelliti (NGS).

Per ovviare ai problemi relativi ai vari approcci per l'identificazione del dMMR/MSI-H sono stati introdotti protocolli diagnostici che utilizzano NGS per il rilevamento di MSI attraverso l'analisi dei geni MMR e della determinazione del carico mutazionale (*Tumor mutational burden*, TMB). Differenti pannelli genici sono disponibili per valutare l'instabilità dei microsatelliti e TMB. Nel 2017 la piattaforma diagnostica MSK-IMPACT (*Memorial Sloan Kettering-Integrated Mutation Profiling of Actionable Cancer Targets*) è stata approvata dalla FDA per rilevare l'instabilità dei microsatelliti nel tessuto neoplastico. Rispetto ai metodi tradizionali, l'uniformità dei risultati dei controlli di MSK-IMPACT può superare il 90% (18). Nel 2018, la piattaforma diagnostica *FoundationOne CDx* (F1CDx) di *Foundation Medicine* (FMI) è stata approvata dalla FDA per analisi genomica dei tumori e può essere impiegata anche per l'analisi MSI (19).

Conclusioni

Il deficit del sistema di riparazione MMR del DNA con il risultante fenotipo molecolare (MSI) definisce un gruppo di tumori caratterizzati da alti carichi mutazionali e potenzialmente responsivi a farmaci immunoterapici (10). Attualmente la determinazione dello stato MMR viene effettuata - indipendentemente dal tipo di tumore - seguendo criteri e metodiche (analisi del DNA e/o IIC) mutuata dall'analisi dMMR/MSI-H del carcinoma colo-rettale. I vantaggi e i limiti dell'analisi basata su DNA e di quella basata sull'IIC delle proteine MMR sono complementari ma si equivalgono nella sostanza. Sono accettabili protocolli diagnostici che utilizzino in prima linea sia l'IIC che l'analisi di DNA. Tuttavia, in un laboratorio di riferimento debbono essere disponibili entrambe le metodiche. La scelta di quella da utilizzare in prima linea è dettata dalle disponibilità ed esigenze dei diversi centri biomedici. Come altri aspetti della diagnostica molecolare le tecnologie per la determinazione di MSI sono in evoluzione. Tale evoluzione contempla l'utilizzo di piattaforme diagnostiche NGS.

Bibliografia

1. Kawasoe Y, Tsurimoto T, Nakagawa T *et al.* (2016) MutSalpα maintains the mismatch repair capability by inhibiting PCNA unloading. *Elife* **5**.
 2. Sinicrope FA, Sargent DJ (2012) Molecular pathways: microsatellite instability in colorectal cancer: prognostic, predictive, and therapeutic implications. *Clin Cancer Res* **18**, 1506-1512.
 3. Lower SS, McGurk MP, Clark AG *et al.* (2018) Satellite DNA evolution: old ideas, new approaches. *Curr Opin Genet Dev* **49**, 70-78.
 4. Tariq K, Ghias K (2016) Colorectal cancer carcinogenesis: a review of mechanisms. *Cancer Biol Med* **13**, 120-135.
 5. Hampel H, Frankel WL, Martin E *et al.* (2008) Feasibility of screening for Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. *J Clin Oncol* **26**, 5783-5788.
 6. Bonneville R, Krook MA, Kautto EA *et al.* (2017) Landscape of Microsatellite Instability Across 39 Cancer Types. *JCO Precis Oncol* **2017**.
 7. Evrard C, Tachon G, Randrian V *et al.* (2019) Microsatellite Instability: Diagnosis, Heterogeneity, Discordance, and Clinical Impact in Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)* **11**.
 8. Vasen HF, Moslein G, Alonso A *et al.* (2010) Recommendations to improve identification of hereditary and familial colorectal cancer in Europe. *Fam Cancer* **9**, 109-115.
 9. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR *et al.* (1998) A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* **58**, 5248-5257.
 10. Le DT, Durham JN, Smith KN *et al.* (2017) Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science* **357**, 409-413.
 11. Suraweera N, Duval A, Reperant M *et al.* (2002) Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR. *Gastroenterology* **123**, 1804-1811.
 12. Morandi L, de Biase D, Visani M *et al.* (2012) T([20]) repeat in the 3'-untranslated region of the MT1X gene: a marker with high sensitivity and specificity to detect microsatellite instability in colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* **27**, 647-656.
 13. Pepe F, Smeraglio R, Vacirca D *et al.* (2017) Microsatellite instability evaluation by automated microfluidic electrophoresis: an update. *J Clin Pathol* **70**, 90-91.
 14. Acharya S, Wilson T, Gradia S *et al.* (1996) hMSH2 forms specific mismatch-binding complexes with hMSH3 and hMSH6. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13629-13634.
 15. Bao F, Panarelli NC, Rennert H *et al.* (2010) Neoadjuvant therapy induces loss of MSH6 expression in colorectal carcinoma. *Am J Surg Pathol* **34**, 1798-1804.
 16. Shia J (2008) Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing for screening colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. Part I. The utility of immunohistochemistry. *J Mol Diagn* **10**, 293-300.
-

17. Overbeek LI, Ligtenberg MJ, Willems RW *et al.* (2008) Interpretation of immunohistochemistry for mismatch repair proteins is only reliable in a specialized setting. *Am J Surg Pathol* **32**, 1246-1251.
 18. Cheng DT, Prasad M, Chekaluk Y *et al.* (2017) Comprehensive detection of germline variants by MSK-IMPACT, a clinical diagnostic platform for solid tumor molecular oncology and concurrent cancer predisposition testing. *BMC Med Genomics* **10**, 33.
 19. (2018) First Comprehensive Companion Diagnostic OK'd. *Cancer Discov* **8**, OF4.
-


2.3 Approvazione agnostica di Immune-checkpoint Inibitori e attuali indicazioni terapeutiche

Come già accennato, nel maggio 2017 pembrolizumab è stato il primo farmaco a ricevere l'approvazione "agnostica" segnando uno spartiacque nella storia della medicina di precisione (1-3). L'FDA, infatti, ha concesso l'approvazione accelerata di pembrolizumab nel trattamento di pazienti adulti e pediatrici con tumori solidi non resecabili o metastatici, MSI-H o con dMMR in progressione dopo un precedente trattamento e senza una adeguata alternativa terapeutica. Questa approvazione si è basata sui dati di efficacia e sicurezza ottenuti da cinque distinti studi di fase I o II multi-coorte, multicentrici, a singolo braccio (KEYNOTE-12, 28, 16, 158, and 164) (4-5). Tra i 149 pazienti affetti da 15 tipi di tumore diversi, pembrolizumab ha dimostrato un tasso di risposta globale (ORR) del 39,6% (IC al 95%: 31,7-47,9), con una percentuale di risposta completa (CR) pari al 7% e una durata della risposta oltre 6 mesi nei 78% dei casi (5). La dose di pembrolizumab raccomandata per questa indicazione è di 200 mg per gli adulti o 2 mg/kg (fino a un massimo di 200 mg) per i bambini, somministrati per infusione endovenosa ogni 3 settimane fino a progressione di malattia, tossicità inaccettabile o fino a 24 mesi in pazienti liberi da progressione di malattia. La prescrizione di pembrolizumab include una "Limitazione d'uso" nei pazienti pediatrici con tumori del sistema nervoso centrale MSI-H dove la sicurezza e l'efficacia del farmaco non è stata stabilita (6).

Nel gennaio 2019, pembrolizumab ha ricevuto l'approvazione normativa dal Ministero della salute, del lavoro e del welfare (MHLW) in Giappone sulla base dei risultati degli studi di fase II KEYNOTE-164 e KEYNOTE-158 (6-8).

Recentemente sono stati presentati al congresso dell'*American Society of Clinical Oncology* (ASCO) del 2020 i dati di *real-world* di pazienti con tumori solidi MSI-H trattati con pembrolizumab a partire da maggio 2017, selezionati dal database clinico-genomico di *Flatiron Health-Foundation Medicine* (FH-FMI). In totale, 33.395 pazienti con tumori solidi sono stati testati per MSI mediante una profilazione genomica completa (CGP) dal 01/2011 al 09/2019. Dei 557 pazienti (1,7%) MSI-H, 129 pazienti con 33 tipi di tumore diversi hanno ricevuto la prima somministrazione di pembrolizumab dopo maggio 2017. Cinquantadue pazienti (40%) presentavano un'alterazione MMR concomitante (MLH1, MSH2, MSH6 o PMS2). Il CRC (N=36) ed il carcinoma endometriale (N=39) rappresentavano le più comuni neoplasie. L'OS mediana ha superato 1 anno in tutti i pazienti, sia nella coorte dei pazienti affetti da CRC e da carcinoma endometriale, sia nelle altre popolazioni (9).

Sempre all'ASCO 2020 sono stati presentati i risultati di un'analisi ad interim dello studio di fase III KEYNOTE-177 in una coorte di 307 pazienti con carcinoma del colon-retto metastatico dMMR/MSI-H. I pazienti sono stati randomizzati a ricevere pembrolizumab in prima linea fino a due anni oppure uno tra sei diversi regimi chemioterapici standard a scelta dell'investigatore. La



PFS è risultata di 16,5 mesi nel braccio trattato con pembrolizumab contro 8,2 mesi nel braccio di confronto, così come il tasso di risposte obiettive, risultato superiore nei pazienti trattati con l'anti-PD-1.

Nonostante questi dati interessanti, restano comunque indispensabili ulteriori studi atti a definire l'efficacia del trattamento nelle singole neoplasie, determinare il miglior metodo per testare MSI e individuare altre caratteristiche genomiche con l'obiettivo di migliorare la selezione del trattamento.

Bibliografia

1. FDA. FDA approves keytruda (pembrolizumab) as first cancer treatment for any solid tumor with a specific genetic feature. Available at <https://www.drugs.com/newdrugs/fda-approves-keytruda-pembrolizumab-first-cancer-any-solid-tumor-specific-genetic-feature-4538.htm>. Accessed April 17, 2020
2. Lemery S, Keegan P, Pazdur R. First FDA Approval Agnostic of Cancer Site - When a Biomarker Defines the Indication. *N Engl J Med*. 2017;377(15):1409-12
3. Looney AM, Nawaz K, Webster RM. Tumour-agnostic therapies. *Nature reviews. Drug Discovery*. 2020 Jun 1;19(6):383-4. doi: 10.1038/d41573-020-00015-1
4. Le DT, Durham JN, Smith KN, Wang H, Bartlett BR, Aulakh LK, et al. Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science*. 2017;357(6349):409-13.
5. Marcus L, Lemery SJ, Keegan P, Pazdur R. FDA approval summary: pembrolizumab for the treatment of microsatellite instability-high solid tumors. *Clinical Cancer Research*. 2019 Jul 1;25(13):3753-8.
6. Merck. Merck's KEYTRUDA® (pembrolizumab) receives five new approvals in Japan, including in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC), as adjuvant therapy for melanoma, and in advanced microsatellite instability-high (MSI-H) tumors. Available at <https://www.mrknewsroom.com/news-release/oncology/mercks-keytruda-pembrolizumab-receives-five-new-approvals-japan-including-adv>. Accessed April 17, 2020.
7. Le DT, Kim TW, Van Cutsem E, et al. Phase II Open-Label Study of Pembrolizumab in Treatment-Refractory, Microsatellite Instability-High/Mismatch Repair-Deficient Metastatic Colorectal Cancer: KEYNOTE-164. *J Clin Oncol*. 2020;38(1):11-19. doi: 10.1200/JCO.19.02107
8. Marabelle A, Le DT, Ascierto PA, et al. Efficacy of Pembrolizumab in Patients with Noncolorectal High Microsatellite Instability/Mismatch Repair-Deficient Cancer: Results From the Phase II KEYNOTE-158 Study. *J Clin Oncol*. 2020;38(1):1-10. doi: 10.1200/JCO.19.02105
9. Tamara Snow, Akshay Swaminathan, Jeremy Snider, Alexa Betzig Schrock, Gerald Li, Brian Michael Alexander, Gaurav Singal, Emily Castellanos, Margaret Elizabeth McCusker; Flatiron Health, New York, NY; Foundation Medicine, Inc., Cambridge, MA. Characteristics and outcomes of real-world (RW) patients (pts) with microsatellite instability-high (MSI-H) solid tumors treated with pembrolizumab monotherapy (P) after FDA approval. *J Clin Oncol* 38: 2020 (suppl; abstr 3060). 10.1200/JCO.2020.38.15_suppl.3060

3. Inibitori di “Tropomyosin Receptor Kinase (TRK)”

3.1 “TRK fusion” nei tumori solidi

L'alterazione molecolare rappresentata dalle fusioni di *NTRK1/NTRK2/NTRK3*, note come “*NTRK-fusions*”, costituisce uno degli esempi più paradigmatici di alterazione genetica, “*driver*” e potenziale bersaglio farmacologico, trasversale a multiple istologie tumorali. Questa caratteristica di “indipendenza istologica”, come noto non automaticamente applicabile in tutti i casi in cui una data mutazione si riscontri in patologie diverse, è fondante per il concetto di *basket trial* e per l'indicazione agnostica del trattamento con farmaci inibitori specifici.

Biologia e signaling.

I geni *NTRK1*, *NTRK2* ed *NTRK3* codificano per una famiglia di recettori extracellulari di neurotropine, rispettivamente TRKA, TRKB ed TRKC, in grado di legare ad alta affinità i rispettivi ligandi: NGF (*neurotrophin growth factor*) per TRKA, BDNF (*Brain derived neurotrophic factor*) o neurotropina 4 (NT-4) per TRKB, NT-3 per TRKC, determinando conseguente omodimerizzazione ed attivazione (1-3).

La porzione recettoriale extracellulare è costituita da 2 domini *Ig like* (Ig1 ed Ig2) e 3 motivi ricchi di leucina (RRL1-3) fiancheggiati da 2 *clusters* cisteinici (C1-C2). Il dominio Ig2, posto in prossimità della regione transmembrana, è quello prevalentemente interessato dall'interazione con il ligando. A livello intracellulare è presente un dominio tirosin-chinasico che va incontro ad autofosforilazione a seguito dell'omodimerizzazione recettoriale, con conseguente attivazione e trasduzione del segnale(4,5). Esistono possibili isoforme, risultato di varianti di splicing dei recettori TRK, capaci di diverso grado di affinità verso i rispettivi ligandi o anche di attivazione costitutiva ligando-indipendente, come ad esempio nel caso della variante TRKAIII (delezione di esoni 6, 7) riscontrata nel neuroblastoma (6).


La trasduzione del segnale, a seguito di fosforilazione dei residui tirosinici intracellulari, determina il reclutamento ed attivazione di proteine *adaptor* quali SHC, FRS2 e PLC γ . I principali *pathways* conseguentemente coinvolti a valle sono quelli di MAPK, PI3K ed PKC. L'attivazione di TRKA, TRKB e TRKC, converge in ultimo sulla trascrizione genica di fattori implicati e fondamentali nel differenziamento, proliferazione e sopravvivenza neuronale, nonché formazione e plasticità sinaptica. Fisiologicamente i geni *NTRK* sono prevalentemente trascritti a livello del sistema nervoso, nell'adulto così come anche durante le fasi di sviluppo embrionale (1,5).

I recettori TRK possono essere interessati da mutazioni somatiche o variazioni di *splicing*, con implicazioni biologiche in corso di definizione ed apparentemente contenute, ma sono i processi di fusione a rivestire un ruolo centrale in ambito tumorale e costituire *targets* con importanti implicazioni cliniche.

Mutazioni ed iperespressione genica.

Mutazioni somatiche a carico dei domini intracellulari o anche di interazione con il ligando sono state riportate in diverse tipologie tumorali (*es.* CRC, carcinoma del polmone a cellule non piccole NSCLC, Melanoma), (7-9). L'impatto biologico di tali mutazioni non è completamente definito, con dati che protendono verso una sovrapposizione funzionale con la forma nativa. Varianti di *splicing* possono intervenire con generazione di proteine mutate funzionalmente attive. In particolare, sono note delezioni a carico della porzione extracellulare coinvolgente il sito di interazione con il ligando a carico di TRKA. Le varianti TRKAIII e Δ TRKA sono state riscontrate in neuroblastoma e leucemie mieloidi, dimostrando uno stato di auto-attivazione ligando-indipendente, in grado di determinare trasformazione tumorale in modelli in vitro (6,10). L'ipotesi derivante è l'esistenza di domini a regolazione negativa (autoinibitori) a livello delle porzioni delete.

Anche l'iperespressione di TRK è stata descritta in diverse forme tumorali, ma il significato biologico resta dibattuto e probabilmente condizionato dal contesto istologico o compresenza di altre alterazioni geniche (11,12). Riscontri di associazione con un andamento clinico più favorevole



sono ad esempio presenti nel neuroblastoma con iperespressione di TRKA e TRKC mentre la stessa, a carico di TRKB, caratterizza prevalentemente forme di più alto grado ed aggressività in associazione ad amplificazioni di *MYCN* (13).

Cambiando contesto, in modelli di carcinoma mammario, ritroviamo invece l'iperespressione di TRKA e TRKC in associazione ad aumentata proliferazione ed aggressività tumorale (11).


Fusione TRK

La generazione di proteine di fusione è l'alterazione *driver* più frequente che coinvolge i prodotti dei geni *NTRK*. Riarrangiamenti, solitamente coinvolgenti la porzione genica corrispondente ai domini di attivazione e trasduzione del segnale, possono avvenire frequentemente a livello intracromosomico e meno frequentemente anche inter-cromosomico. Il gene *partner* della fusione riveste un ruolo fondamentale nel meccanismo di attivazione, localizzazione intracellulare del prodotto e via di trasduzione del segnale. La presenza al suo livello di domini oligomerizzanti è la modalità più frequente di attivazione in assenza di ligando. Ulteriori possibilità includono la sostituzione, da parte del nuovo gene, di porzioni di *NTRK* originariamente a funzione autoinibitoria o, ancora, una capacità trasformante intrinseca da parte della nuova porzione genica (1,14). Attualmente più di 80 *partners* genici di fusione sono stati descritti in molteplici tipologie tumorali (15).

Le proteine di fusione *NTRK* possono avvalersi delle vie di trasduzione del segnale proprie della controparte fisiologica, con reclutamento degli *adaptor* SHC, IRS1, FRS2/3 e successiva attivazione di MAPK o PI3K (16-18). Sono comunque dimostrati casi in cui il segnale di attivazione sfrutta attivatori differenti, variabili a seconda dei contesti istologici. La proteina di fusione *ETV6-NTRK3*, individuata nel fibrosarcoma congenito, manca della capacità di reclutare SHC ma determina comunque attivazione di MAPK con un meccanismo dipendente dall'interazione con il complesso IGF1/IGFRS1 a livello di membrana che attiva la via PI3K/AKT (19,20). La stessa proteina, nel contesto dell'analogo del carcinoma secretorio mammario (MASC), trasduce il segnale attivatorio attraverso STAT3 e PLC γ (21). In linee cellulari di carcinoma del colon e polmonare sembrano prevalere le trasduzioni SHC-MPK dipendenti, sebbene anche l'attivazione di STAT3 e PI3K sia stata riportata (22). In corso di studio sono i possibili *pathways* attivati in ambito di neoplasie ematologiche, a questo livello la linea di leucemia acuta promielocitica AP-1060 rappresenta l'unico esempio attualmente individuato di neoplasia ematologica con un driver generato da fusione TRK, nonché sensibile ad inibitori specifici(23). La via molecolare attivata può infine essere influenzata anche dalla localizzazione subcellulare del prodotto di fusione, condizionata come detto dal partner di fusione. Esempio ne è il prodotto TFG-TRKA che, con la sua localizzazione a livello del reticolo endoplasmico, determina una preferenziale attivazione di ERK1 ed ERK2 (24).

Prevalenza di NTRK-fusion nei tumori.

Fusioni *driver* a carico di TRK sono state riscontrate globalmente in una quota non superiore al 1% di tutti i tumori, ma con una peculiare doppia modalità di distribuzione. La prima, ad alta frequenza nell'ambito di alcune neoplasie molto rare, la seconda con frequenze estremamente minori nel contesto di tumori molto diffusi (15). La fusione *ETV6-NTRK3* è sostanzialmente considerabile



patognomonica (80-90%) di rare neoplasie pediatriche e dell'adulto, come il Fibrosarcoma infantile (IFS) e Mesonefroma congenito (CMN), carcinoma mammario secretorio (SBC) o l'analogo di tale neoplasia a livello delle ghiandole salivari (MASC)(21,25-27). IFS e CMN, anche se più raramente, possono presentare anche ulteriori riarrangiamenti di *NTRK3*(28), mentre *ETV6* risulta al momento l'unico *partner* di fusione individuato nel caso di SBC e MASC (15). Frequenze minori di riarrangiamenti a livello di *NTRK* sono state poi riscontrate in neoplasie più comuni. Una prevalenza compresa tra il 5 e 25% è descritta per carcinomi papillari della tiroide, con prevalente riarrangiamento di *NTRK1* ed *ETV6-NTRK3*, Neoplasie spitzoidi e tumori gastrointestinali stromali (GIST) (mancanti delle classiche mutazioni driver in *KIT*, *PDGFRA* o *RAS*)(1,29). Frequenze ancora minori (<5%, e più propriamente <1%) ricorrono in tumori del colon, polmone, pancreas, vie biliari, testa e collo, rene, melanoma, sarcomi dei tessuti molli (1,15,30). È importante, per le prospettive terapeutiche offerte dalle nuove immunoterapie, sottolineare come i riarrangiamenti di *NTRK* si associno a maggior carico mutazionale e condizioni di instabilità microsatellitare (MSI) nell'ambito dei tumori del colon-retto (15,31-33). Nell'ambito delle neoplasie ematologiche, riscontri di fusioni a carico di *NTRK* sono stati riportati per leucemia acute linfatiche e mieloidi (1,15,34,35), con riscontro anche di una risposta clinica ad inibitore specifico in un caso di leucemia acuta promielocitica con riarrangiamento *ETV6-NTRK2* (1,36).

Bibliografia

1. Cocco E, Scaltriti M, Drilon A. NTRK fusion-positive cancers and TRK inhibitor therapy. *Nat Rev Clin Oncol* **2018**;15(12):731-47 doi 10.1038/s41571-018-0113-0.
2. Davies AM, Horton A, Burton LE, Schmelzer C, Vandlen R, Rosenthal A. Neurotrophin-4/5 is a mammalian-specific survival factor for distinct populations of sensory neurons. *J Neurosci* **1993**;13(11):4961-7.
3. Soppet D, Escandon E, Maragos J, Middlemas DS, Reid SW, Blair J, *et al*. The neurotrophic factors brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 are ligands for the trkB tyrosine kinase receptor. *Cell* **1991**;65(5):895-903 doi 10.1016/0092-8674(91)90396-g.
4. Deinhardt K, Chao MV. Trk receptors. *Handb Exp Pharmacol* **2014**;220:103-19 doi 10.1007/978-3-642-45106-5_5.
5. Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **2010**;141(7):1117-34 doi 10.1016/j.cell.2010.06.011.
6. Tacconelli A, Farina AR, Cappabianca L, Desantis G, Tessitore A, Vetuschi A, *et al*. TrkA alternative splicing: a regulated tumor-promoting switch in human neuroblastoma. *Cancer Cell* **2004**;6(4):347-60 doi 10.1016/j.ccr.2004.09.011.
7. Geiger TR, Song JY, Rosado A, Peeper DS. Functional characterization of human cancer-derived TRKB mutations. *PLoS One* **2011**;6(2):e16871 doi 10.1371/journal.pone.0016871.
8. Harada T, Yatabe Y, Takeshita M, Koga T, Yano T, Wang Y, *et al*. Role and relevance of TrkB mutations and expression in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* **2011**;17(9):2638-45 doi 10.1158/1078-0432.CCR-10-3034.
9. Miranda C, Mazzoni M, Sensi M, Pierotti MA, Greco A. Functional characterization of NTRK1 mutations identified in melanoma. *Genes Chromosomes Cancer* **2014**;53(10):875-80 doi 10.1002/gcc.22200.
10. Tomasson MH, Xiang Z, Walgren R, Zhao Y, Kasai Y, Miner T, *et al*. Somatic mutations and germline sequence variants in the expressed tyrosine kinase genes of patients with de novo acute myeloid leukemia. *Blood* **2008**;111(9):4797-808 doi 10.1182/blood-2007-09-113027.
11. Lagadec C, Meignan S, Adriaenssens E, Foveau B, Vanhecke E, Romon R, *et al*. TrkA overexpression enhances growth and metastasis of breast cancer cells. *Oncogene* **2009**;28(18):1960-70 doi 10.1038/onc.2009.61.
12. Eggert A, Grotzer MA, Ikegaki N, Liu XG, Evans AE, Brodeur GM. Expression of the neurotrophin receptor TrkA down-regulates expression and function of angiogenic stimulators in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Cancer Res* **2002**;62(6):1802-8.

13. Nakagawara A, Azar CG, Scavarda NJ, Brodeur GM. Expression and function of TRK-B and BDNF in human neuroblastomas. *Mol Cell Biol* **1994**;14(1):759-67 doi 10.1128/mcb.14.1.759.
14. Vaishnavi A, Le AT, Doebele RC. TRKking down an old oncogene in a new era of targeted therapy. *Cancer Discov* **2015**;5(1):25-34 doi 10.1158/2159-8290.CD-14-0765.
15. Amatu A, Sartore-Bianchi A, Bencardino K, Pizzutilo EG, Tosi F, Siena S. Tropomyosin receptor kinase (TRK) biology and the role of NTRK gene fusions in cancer. *Ann Oncol* **2019**;30 Suppl 8:viii5-viii15 doi 10.1093/annonc/mdz383.
16. Borrello MG, Pelicci G, Arighi E, De Filippis L, Greco A, Bongarzone I, *et al.* The oncogenic versions of the Ret and Trk tyrosine kinases bind Shc and Grb2 adaptor proteins. *Oncogene* **1994**;9(6):1661-8.
17. Miranda C, Greco A, Miele C, Pierotti MA, Van Obberghen E. IRS-1 and IRS-2 are recruited by TrkA receptor and oncogenic TRK-T1. *J Cell Physiol* **2001**;186(1):35-46 doi 10.1002/1097-4652(200101)186:1<35::AID-JCP1003>3.0.CO;2-X.
18. Ranzi V, Meakin SO, Miranda C, Mondellini P, Pierotti MA, Greco A. The signaling adapters fibroblast growth factor receptor substrate 2 and 3 are activated by the thyroid TRK oncoproteins. *Endocrinology* **2003**;144(3):922-8 doi 10.1210/en.2002-221002.
19. Tognon CE, Martin MJ, Moradian A, Trigo G, Rotblat B, Cheng SW, *et al.* A tripartite complex composed of ETV6-NTRK3, IRS1 and IGF1R is required for ETV6-NTRK3-mediated membrane localization and transformation. *Oncogene* **2012**;31(10):1334-40 doi 10.1038/ncr.2011.323.
20. Jin W, Yun C, Hobbie A, Martin MJ, Sorensen PH, Kim SJ. Cellular transformation and activation of the phosphoinositide-3-kinase-Akt cascade by the ETV6-NTRK3 chimeric tyrosine kinase requires c-Src. *Cancer Res* **2007**;67(7):3192-200 doi 10.1158/0008-5472.CAN-06-3526.
21. Drilon A, Li G, Dogan S, Gounder M, Shen R, Arcila M, *et al.* What hides behind the MASC: clinical response and acquired resistance to entrectinib after ETV6-NTRK3 identification in a mammary analogue secretory carcinoma (MASC). *Ann Oncol* **2016**;27(5):920-6 doi 10.1093/annonc/mdw042.
22. Vaishnavi A, Capelletti M, Le AT, Kako S, Butaney M, Ercan D, *et al.* Oncogenic and drug-sensitive NTRK1 rearrangements in lung cancer. *Nat Med* **2013**;19(11):1469-72 doi 10.1038/nm.3352.
23. Chen S, Nagel S, Schneider B, Dai H, Geffers R, Kaufmann M, *et al.* A new ETV6-NTRK3 cell line model reveals MALAT1 as a novel therapeutic target - a short report. *Cell Oncol (Dordr)* **2018**;41(1):93-101 doi 10.1007/s13402-017-0356-2.
24. Witte K, Schuh AL, Hegermann J, Sarkeshik A, Mayers JR, Schwarze K, *et al.* TFG-1 function in protein secretion and oncogenesis. *Nat Cell Biol* **2011**;13(5):550-8 doi 10.1038/ncb2225.
25. Davis JL, Lockwood CM, Albert CM, Tsuchiya K, Hawkins DS, Rudzinski ER. Infantile NTRK-associated Mesenchymal Tumors. *Pediatr Dev Pathol* **2018**;21(1):68-78 doi 10.1177/1093526617712639.
26. Knezevich SR, Garnett MJ, Pysher TJ, Beckwith JB, Grundy PE, Sorensen PH. ETV6-NTRK3 gene fusions and trisomy 11 establish a histogenetic link between mesoblastic nephroma and congenital fibrosarcoma. *Cancer Res* **1998**;58(22):5046-8.
27. Skálová A, Vanecek T, Sima R, Laco J, Weinreb I, Perez-Ordóñez B, *et al.* Mammary analogue secretory carcinoma of salivary glands, containing the ETV6-NTRK3 fusion gene: a hitherto undescribed salivary gland tumor entity. *Am J Surg Pathol* **2010**;34(5):599-608 doi 10.1097/PAS.0b013e3181d9efcc.
28. Rubin BP, Chen CJ, Morgan TW, Xiao S, Grier HE, Kozakewich HP, *et al.* Congenital mesoblastic nephroma t(12;15) is associated with ETV6-NTRK3 gene fusion: cytogenetic and molecular relationship to congenital (infantile) fibrosarcoma. *Am J Pathol* **1998**;153(5):1451-8 doi 10.1016/S0002-9440(10)65732-X.
29. Amatu A, Sartore-Bianchi A, Siena S. gene fusions as novel targets of cancer therapy across multiple tumour types. *ESMO Open* **2016**;1(2):e000023 doi 10.1136/esmoopen-2015-000023.
30. Drilon A, Laetsch TW, Kummar S, DuBois SG, Lassen UN, Demetri GD, *et al.* Efficacy of Larotrectinib in TRK Fusion-Positive Cancers in Adults and Children. *N Engl J Med* **2018**;378(8):731-9 doi 10.1056/NEJMoa1714448.
31. Sartore-Bianchi A, Ardini E, Bosotti R, Amatu A, Valtorta E, Somaschini A, *et al.* Sensitivity to Entrectinib Associated With a Novel LMNA-NTRK1 Gene Fusion in Metastatic Colorectal Cancer. *J Natl Cancer Inst* **2016**;108(1) doi 10.1093/jnci/djv306.
32. Kloosterman WP, Coebergh van den Braak RRJ, Pieterse M, van Roosmalen MJ, Sieuwerts AM, Stangl C, *et al.* A Systematic Analysis of Oncogenic Gene Fusions in Primary Colon Cancer. *Cancer Res* **2017**;77(14):3814-22 doi 10.1158/0008-5472.CAN-16-3563.
33. Pietrantonio F, Di Nicolantonio F, Schrock AB, Lee J, Tejpar S, Sartore-Bianchi A, *et al.* ALK, ROS1, and NTRK Rearrangements in Metastatic Colorectal Cancer. *J Natl Cancer Inst* **2017**;109(12) doi 10.1093/jnci/djx089.

34. Roberts KG, Li Y, Payne-Turner D, Harvey RC, Yang YL, Pei D, *et al.* Targetable kinase-activating lesions in Ph-like acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* **2014**;371(11):1005-15 doi 10.1056/NEJMoa1403088.
35. Eguchi M, Eguchi-Ishimae M, Tojo A, Morishita K, Suzuki K, Sato Y, *et al.* Fusion of ETV6 to neurotrophin-3 receptor TRKC in acute myeloid leukemia with t(12;15)(p13;q25). *Blood* **1999**;93(4):1355-63.
36. Taylor J, Pavlick D, Yoshimi A, Marcelus C, Chung SS, Hechtman JF, *et al.* Oncogenic TRK fusions are amenable to inhibition in hematologic malignancies. *J Clin Invest* **2018**;128(9):3819-25 doi 10.1172/JCI120787.


3.2 Tecniche diagnostiche disponibili

Come descritto precedentemente, le chinasi recettoriali TRKA, TRKB e TRKC codificate dai geni *Tropomyosin receptor kinase A, B and C (NTRK1, NTRK2 e NTRK3)* sono costituite da una porzione extracellulare formata da domini *Immunoglobulin-like (Ig2)*, cui si lega il fattore neurotrofico, da un dominio idrofobico trans-membrana e da una porzione intra-citoplasmatica; quest'ultima è responsabile dell'attivazione del *pathway* recettoriale attraverso l'oligodimerizzazione e la fosforilazione dei residui di tirosina (1-3). Mentre le delezioni in frame (descritte in neoplasie ematologiche) o le mutazioni puntiformi di regioni introniche, responsabili di splicing aberrante, sono rare, le alterazioni strutturali sotto forma di fusioni geniche rappresentano il meccanismo più frequente di attivazione delle chinasi TRK (4- 6). Questi eventi prevedono il riarrangiamento inter o intra-cromosomico della porzione 3' del recettore TRK con la porzione regolatoria 5' di differenti *partners* di fusione(7). Il riarrangiamento più frequente (>95%) è quello *ETV6-NTRK3*, ma oltre 25 diversi *partners* di fusione sono stati identificati ed in ogni caso, la porzione catalitica al 3' rimane intatta rendendo il recettore costituzionalmente attivo (8-10).

Le metodologie diagnostiche inizialmente impiegate per la caratterizzazione delle alterazioni delle chinasi TRK partendo da campioni di tessuto (istologici e citologici) fissati in formalina ed inclusi in paraffina (FFPE) comprendono l'ibridazione in situ con sonde fluorescenti (FISH), l'IIC e la *Real - Time PCR (RT -PCR)*. (11, 12) Successivamente, anche in conseguenza dell'incremento nel numero di marcatori predittivi di risposta al trattamento con farmaci a bersaglio molecolare approvati in pratica clinica, l'implementazione delle piattaforme di NGS ha subito un notevole incentivo (13, 14).

IIC

Completata l'embriogenesi, di norma la IIC per la rilevazione delle proteine TRK è positiva nelle sole cellule del sistema nervoso. Al contrario la positività della IIC per le proteine TRK nelle cellule neoplastiche è patologica ed indicativa dell'avvenuta fusione genica (15). Sono attualmente disponibili anticorpi in grado di riconoscere l'intera sequenza proteica della specifica isoforma (clone EP1058Y; *Abcam*, Cambridge, MA, USA, clone 80G2; *Cell Signaling Technology*, Boston, MA, USA) (16- 18) o capaci di legare la porzione carbossi- terminale di TRKA/B/C (clone EPR17341, *Roche Tissue Diagnostics/Ventana*, Basilea, Svizzera). (19- 22) La sensibilità (93- 100%) e la specificità (95- 100%) della valutazione di TRK mediante IIC sono molto elevate, con minime differenze relative al target del clone anticorpale (20-21), alla localizzazione cellulare della chimera ed il *partner* genico coinvolto nella fusione (19). Quindi, l'immunoistochimica rappresenta una delle metodiche d'elezione anche perché consente di verificare che i trascritti aberranti sono



stati effettivamente tradotti in proteina, oltre ad essere robusta, economicamente vantaggiosa e caratterizzata da breve *turnaround time* (TAT). (17- 20). Recentemente è stato proposto l'uso del test IIC su *tissue microarrays* (TMAs) al fine di ridurre ulteriormente i costi e i tempi di analisi e favorire la diffusione, nella pratica clinica, di un test di screening per tutti i pazienti con tumori maligni infiltranti, indipendentemente dall'istotipo (13). I limiti della IIC sono l'impossibilità di specificare il partner di fusione, la disponibilità di procedure validate per i soli campioni FFPE, oltre ad una ridotta specificità nelle cellule del sistema nervoso, dove l'espressione di TRK è costitutiva seppur a bassi livelli (21, 22).


FISH

La FISH è impiegata in modo diffuso per la rilevazione delle fusioni geniche (23). Nello specifico, diversi *kit* sono disponibili in commercio, come ad esempio *l'NTRK1 Break Apart FISH Probe kit* (Abbott Laboratories, Chicago, USA) (24, 26). In alternativa è possibile eseguire l'analisi attraverso il disegno di sonde *custom* [TRK BAC clones 5' (RP11-1047J23) e 3' (RP11-1038N13)], ma in questo caso i processi di validazione acquisiscono un ruolo importantissimo, prima di procedere all'implementazione del test in pratica clinica (16, 27, 28). Indipendentemente dalle sonde adoperate, alcune raccomandazioni per l'esecuzione di un corretto *workflow* e per la successiva analisi dei risultati devono essere seguite attentamente. Nel dettaglio, per limitare segnali aspecifici, le sezioni di tessuto non devono avere spessore superiore a 4 μm , selezionando per la lettura campi microscopici dove siano identificabili con chiarezza almeno 50 segnali di univoca interpretazione; la conta deve essere eseguita da più di un operatore; la distanza del segnale di fluorescenza delle due sonde deve risultare maggiore rispetto al segnale generato dalla sonda ibridata; infine, il *cut-off* per la rilevazione del segnale di fusione deve essere riscontrato, generalmente, in almeno il 15% dei nuclei contati.(29, 30) L'interpretazione dei risultati è quindi non semplice, così come i costi sono elevati e diverse sezioni tessutali sono necessarie per analizzare TRKA, TRKB e TRKC.

RT - PCR

Rispetto alla FISH, la gestione del campione tissutale risulta più razionale, quando l'analisi dei trascritti di fusione aberranti di TRK si avvale delle procedure basate su RT-PCR, che consentono anche la valutazione a partire da campioni non FFPE (come ad esempio i citologici allestiti mediante striscio diretto). (31) L'approccio basato su RT-PCR risulta specifico (individuando il partner di fusione grazie a specifici *primers*), rapido, economico, con test sviluppati e validati nei singoli laboratori (LDT) o con kit commercialmente disponibili e con relativa certificazione per l'impiego in diagnostica (CE – IVD) (29) Gli svantaggi, invece, sono l'impossibilità di identificare una traslocazione maggiore di 200bp e la difficoltà di evidenziare tutti i trascritti aberranti, vista la variabilità nei possibili *breakpoints* della sequenza di TRK. Inoltre l'estrazione dell'RNA da campioni di tessuto FFPE richiede l'implementazione e la validazione di specifici protocolli. Per tutte queste motivazioni, questo approccio è consigliato come metodica di secondo livello, cioè per la conferma di alterazioni già individuate attraverso altri sistemi diagnostici o per dirimere i casi di dubbia interpretazione (32).

Next Generation Sequencing (NGS)

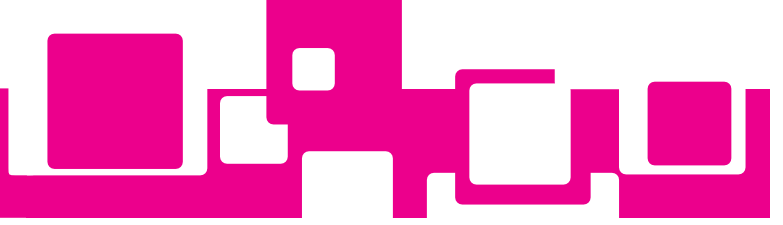


Gli approcci basati su NGS richiedono un'accurata fase pre-analitica ed analitica, sia nell'analisi delle alterazioni note che, nella identificazione e corretta nomenclatura delle alterazioni non ancora annotate (31-33). Nell'analisi *de novo* si utilizzano pannelli genici in grado di analizzare porzioni cromosomiche pur non conoscendo esattamente a priori le traslocazioni di interesse. Esempi di questo approccio, commercialmente disponibili, sono rappresentati ad esempio da Archer DX AMP assay (*Archer Clinical Service*, Colorado, USA) caratterizzato da un limite di sensibilità dello 0.1% che consente l'analisi simultanea di *ALK*, *ROS1*, *RET*; *GeneTrails Solid Tumor Fusion Gene Panel* (*Knight Diagnostic Laboratories*, Oregon, USA), che oltre alle traslocazioni in *NTRK* è in grado di rilevare alterazioni a carico di altri 20 geni; *Universal Fusion/Expression Profile* (*Neogenomics*, Fort Myers, USA), che consente di identificare alterazioni cromosomiche di classi differenti (SNVs, indels, CNVs) in 1385 geni; *Oncomine assays* (*ThermoFisher Scientifics*, Waltham, USA) che oltre alle fusioni dei geni *NTRK*, analizza alterazioni quali SNVs, indels, CNVs in 52 geni (19, 25, 34, 35).

La seconda famiglia di approcci basati su NGS per l'analisi dei trascritti di fusione già noti annovera, tra gli esempi il *Memorial Sloan Kettering Integrated Mutation Profiling of Actionable Cancer Targets* (*MSK-IMPACTTM*, New York, USA), primo dispositivo diagnostico appartenente alla categoria LDT a ricevere l'approvazione dalla FDA. Tale pannello è in grado di analizzare alterazioni strutturali in 469 geni ad una frequenza minima di mutazione del 5%; *UCSF500 Cancer Gene Panel* (*UCSF*, San Francisco, USA) in grado di eseguire l'analisi di oltre 1000 geni con una frequenza minima di mutazione del 5%, *the SmartGenomics Complete—Expanded Solid Tumor* (*PathGroup*, Nashville, USA), il cui *reference range* contempla l'analisi di varianti geniche (mutazioni puntiformi ed indels) in 160 geni e alterazioni cromosomiche (es CNV) in 126 geni, infine il pannello *FoundationOneCDx test* (*Foundation Medicine*, Cambridge, USA) che simultaneamente analizza 315 fusioni tra cui *NTRK1*, *NTRK2* and *NTRK3* (7, 15, 17, 20).

I vantaggi in merito all'utilizzo di piattaforme NGS sono riconducibili alla possibilità di individuare il partner di fusione, di avere un limite di sensibilità 1%, di richiedere una relativamente ridotta quantità del materiale di partenza, consentendo l'analisi simultanea anche di altri marcatori clinicamente rilevanti (17, 20, 34, 35). Gli svantaggi sono connessi ad un elevato costo, un TAT relativamente più lungo rispetto alle altre metodologie (come IHC, FISH ed RT – PCR) e ad un'elevata formazione degli operatori richiesta per la gestione dei dati generati da questi approcci. Inoltre, alcuni dei dispositivi discussi sono disponibili esclusivamente in *outsourcing* e presentano costi relativamente elevati. Altra possibilità che offre l'approccio NGS è quella di procedere allo sviluppo, alla validazione ed alla implementazione di pannelli e protocolli LDT per la ricerca delle fusioni nei geni *NTRK* contestualmente alla rilevazione di altri marcatori predittivi di risposta al trattamento con farmaci a bersaglio molecolare. In questo caso, ancora di più rispetto alle altre metodologie discusse, le fasi di validazioni assumono un significato fondamentale e tale approccio dovrebbe essere perseguito solo da centri con elevato *expertise* e con un congruo carico di campioni.

Algoritmi diagnostici



La determinazione delle fusioni dei geni *NTRK*, come quella di altre alterazioni molecolari per trattamenti agnostici, ha posto non pochi interrogativi relativamente alle migliori strategie o algoritmi diagnostici per superare le difficoltà che inevitabilmente si presentano per l'analisi di mutazioni rare diffuse a molte forme tumorali. Qualunque sia l'approccio utilizzato, si aprono infatti problematiche tecniche relative alla concreta fattibilità, dati i tempi e i costi richiesti per le analisi a tappeto. Nel corso degli ultimi anni sono stati sviluppati alcuni algoritmi diagnostici con l'intento di superare queste difficoltà. Tali algoritmi, basati sui dati di prevalenza delle fusioni dei geni *NTRK* nelle varie forme neoplastiche, possono essere sostanzialmente distinti in algoritmi su base istopatologica ed algoritmi su base genomica (14, 36, 37). Non è questa la sede per affrontare in ulteriore dettaglio i singoli algoritmi prodotti. Gli algoritmi su base istopatologica prevedono analisi più specifiche per i pazienti con tumori rari che presentano un'alta probabilità di fusione dei geni *NTRK*, gli algoritmi su base genomica, più complessi, sono destinati al miglior trattamento di pazienti con tumori frequenti a bassa prevalenza di fusioni.

Al momento attuale, l'identificazione di pazienti neoplastici con fusioni dei geni *NTRK* potrebbe richiedere, in centri di eccellenza diagnostica, l'applicazione di entrambi gli algoritmi.

Conclusioni

In conclusione, la gestione del campione nella fase di allestimento è fondamentale ai fini della caratterizzazione molecolare delle fusioni a carico dei geni *NTRK* (31, 33). La scelta della tecnologia più adeguata è strettamente dipendente dal tipo di analisi, dalla strumentazione del laboratorio e soprattutto dalla disponibilità ed *expertise* di uno staff di laboratorio qualificato e dedicato. Ove la quantità e la qualità del tessuto lo consenta, è preferibile privilegiare l'impiego di metodologie standardizzate e maggiormente diffuse nei laboratori che si occupano della caratterizzazione di biomarcatori predittivi di risposta al trattamento con farmaci biologici, come l'IHC, la RT – PCR o la FISH, impiegando preferibilmente protocolli e kit validati (38, 39).

Nei laboratori che hanno l'adeguato *expertise*, un congruo numero di campioni e capacità di validare protocolli per piattaforme di sequenziamento di nuova generazione, l'NGS è preferibile, al fine di integrare la caratterizzazione delle traslocazioni di *NTRK* nel contesto più ampio della valutazione degli altri marcatori predittivi di risposta clinicamente rilevanti (38, 39).

Al fine di coprire con il test il numero più alto possibile di pazienti positivi per fusioni di *NTRK* nelle diverse forme tumorali, sono stati sviluppati alcuni algoritmi diagnostici. La conoscenza dei vantaggi e degli svantaggi dei diversi metodi per il test *NTRK* e della loro disponibilità potrà ulteriormente migliorare le strategie diagnostiche per questa specifica applicazione.

Bibliografia

1. Cocco E, Scaltriti M, Drilon A. *NTRK* fusion-positive cancers and TRK inhibitor therapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018;15:731-747.
2. Chao MV. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci* 2003; 4: 299–309

3. Geiger TR, Song JY, Rosado A, Peeper DS. Functional characterization of human cancer-derived TRKB mutations. *PLoS One* 2011; 6: e16871
4. Coulier F, Kumar R, Ernst M et al. Human *trk* oncogenes activated by point mutation, in-frame deletion, and duplication of the tyrosine kinase domain. *Mol Cell Biol* 1990; 10(8): 4202–4210.
5. Tacconelli A, Farina AR, Cappabianca L et al. Alternative *TrkAIII* splicing: a potential regulated tumor-promoting switch and therapeutic target in neuroblastoma. *Future Oncol* 2005; 1(5): 689–698.
6. Vaishnavi A, Le AT, Doebele RC. TRKking down an old oncogene in a new era of targeted therapy. *Cancer Discov* 2015; 5(1): 25–34
7. Zehir A, Benayed R, Shah RH et al. Mutational landscape of metastatic cancer revealed from prospective clinical sequencing of 10,000 patients. *Nat Med* 2017; 23: 703–713.
8. Pulciani S, Santos E, Lauver AV et al. Oncogenes in solid human tumours. *Nature* 1982; 300: 539–542. 20.
9. Drilon A, Siena S, Ou SI et al. Safety and antitumor activity of the multitargeted Pan-TRK, ROS1, and ALK inhibitor entrectinib: combined results from two phase I trials (ALKA-372-001 and STARTRK-1). *Cancer Discov* 2017; 7: 400–409.
10. Amatu A, Sartore-Bianchi A, Siena S. NTRK gene fusions as novel targets of cancer therapy across multiple tumour types. *ESMO Open* 2016; 1: e000023.
11. Qaddoumi I, Orisme W, Wen J et al. Genetic alterations in uncommon low-grade neuroepithelial tumors: BRAF, FGFR1, and MYB mutations occur at high frequency and align with morphology. *Acta Neuropathol* 2016; 131: 833–845.
12. Tognon C, Knezevich SR, Huntsman D et al. Expression of the ETV6NTRK3 gene fusion as a primary event in human secretory breast carcinoma. *Cancer Cell* 2002: 367–376
13. Marchetti A, Di Lorito A, Felicioni L et al. An innovative diagnostic strategy for the detection of rare molecular targets to select cancer patients for tumor-agnostic treatments. *Oncotarget*. 2019; 10: 6957–6968.
14. Marchiò C, Scaltriti M, Ladanyi M et al. ESMO recommendations on the standard methods to detect NTRK fusions in daily practice and clinical research. *Ann Oncol*. 2019; 30: 1417–1427.
15. Hechtman JF, Benayed R, Hyman DM et al. Pan-Trk immunohistochemistry is an efficient and reliable screen for the detection of NTRK fusions. *Am J Surg Pathol* 2017; 41: 1547–1551.
16. Milione M, Ardini E, Christiansen J et al. Identification and characterization of a novel SCYL3-NTRK1 rearrangement in a colorectal cancer patient. *Oncotarget* 2017; 8: 55353–55360.
17. Lezcano C, Shoushtari AN, Ariyan C et al. Primary and metastatic melanoma with NTRK fusions. *Am J Surg Pathol* 2018; 42: 1052–1058.
18. Tatematsu T, Sasaki H, Shimizu S et al. Investigation of neurotrophic tyrosine kinase receptor 1 fusions and neurotrophic tyrosine kinase receptor family expression in non-small-cell lung cancer and sensitivity to AZD7451 in vitro. *Mol Clin Oncol* 2014; 2: 725–730.
19. Chiang S, Cotzia P, Hyman DM et al. NTRK fusions define a novel uterine sarcoma subtype with features of fibrosarcoma. *Am J Surg Pathol* 2018; 42: 791–798.
20. Rudzinski ER, Lockwood CM, Stohr BA et al. Pan-Trk immunohistochemistry identifies NTRK rearrangements in pediatric mesenchymal tumors. *Am J Surg Pathol* 2018; 42: 927–935. 39.
21. Potts SJ, Dean EJ, Polikoff J et al. Detecting NTRK, ROS1, and ALK gene fusions in gastrointestinal tumor patients. *J Clin Oncol* 2017; 35: Suppl619.
22. Murphy DA, Ely HA, Shoemaker R et al. Detecting gene rearrangements in patient populations through a 2-step diagnostic test comprised of rapid IHC enrichment followed by sensitive next-generation sequencing. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2017; 25(7): 513–523.
23. Solomon JP, Hechtman JF. Detection of NTRK Fusions: Merits and Limitations of Current Diagnostic Platforms. *Cancer Res*. 2019 1; 79:3163-3168.
24. Vaishnavi A, Capelletti M, Le AT et al. Oncogenic and drug-sensitive NTRK1 rearrangements in lung cancer. *Nat Med* 2013; 19: 1469–1472
25. Church AJ, Calicchio ML, Nardi V et al. Recurrent EML4-NTRK3 fusions in infantile fibrosarcoma and congenital mesoblastic nephroma suggest a revised testing strategy. *Mod Pathol* 2018; 31: 463–473.
26. Farago AF, Le LP, Zheng Z et al. Durable clinical response to entrectinib in NTRK1-rearranged non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2015; 10: 1670–1674.
27. Doebele RC, Davis LE, Vaishnavi A et al. An oncogenic NTRK fusion in a patient with soft-tissue sarcoma with response to the tropomyosin-related kinase inhibitor LOXO-101. *Cancer Discov* 2015; 5: 1049–1057.
28. Skalova A, Vanecek T, Simpson RH et al. Mammary analogue secretory carcinoma of salivary glands: molecular analysis of 25 ETV6 gene rearranged tumors with lack of detection of classical ETV6-NTRK3 fusion transcript by standard RT-PCR: report of 4 cases harboring ETV6-X gene fusion. *Am J Surg Pathol* 2016; 40: 3–13.

29. Skalova A, Vanecek T, Sima R et al. Mammary analogue secretory carcinoma of salivary glands, containing the ETV6-NTRK3 fusion gene: a hitherto undescribed salivary gland tumor entity. *Am J Surg Pathol* 2010; 34: 599–608.
30. Reis-Filho JS, Natrajan R, Vatcheva R et al. Is acinic cell carcinoma a variant of secretory carcinoma? A FISH study using ETV6'split apart' probes. *Histopathology* 2008; 52: 840–846
31. SJ, Zehir A, Sireci AN et al. Detection of Tumor NTRK Gene Fusions to Identify Patients Who May Benefit from Tyrosine Kinase (TRK) Inhibitor Therapy. *J Mol Diagn.* 2019 ;21 :553-571.
32. Frattini V, Trifonov V, Chan JM et al. The integrated landscape of driver genomic alterations in glioblastoma. *Nat Genet* 2013; 45: 1141–1149.
33. Turashvili G, Yang W, McKinney S et al. Nucleic acid quantity and quality from paraffin blocks: defining optimal fixation, processing and DNA/RNA extraction techniques. *Exp Mol Pathol.* 2012 ;92 :33-43.
34. Beadling C, Wald AI, Warrick A et al. A multiplexed amplicon approach for detecting gene fusions by next-generation sequencing. *J Mol Diagn* 2016; 18: 165–175.
35. Conde E, Caminoa A, Dominguez C et al. Aligning digital CD8(p) scoring and targeted next-generation sequencing with programmed death ligand 1 expression: a pragmatic approach in early-stage squamous cell lung carcinoma. *Histopathology* 2018; 72: 270–284.
36. Sgariglia R, Pisapia P, Nacchio M et al. Multiplex digital colour-coded barcode technology on RNA extracted from routine cytological samples of patients with non-small cell lung cancer: pilot study. *J Clin Pathol.* 2017 ;70:803-806.
37. Hsiao SJ, Zehir A, Sireci AN, Aisner DL. Detection of Tumor NTRK Gene Fusions to Identify Patients Who May Benefit from Tyrosine Kinase (TRK) Inhibitor Therapy. *J Mol Diagn.* 2019 21:553-571.
38. Penault-Llorca F, Rudzinski ER, Sepulveda AR. Testing algorithm for identification of patients with TRK fusion cancer. *J Clin Pathol.* 2019; 72:460-467.
39. Geiss GK, Bumgarner RE, Birditt B et al. Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs. *Nat Biotechnol* 2008; 26: 317–325.
39. National Comprehensive Cancer NetworkV R. NCCN Guidelines Version 5.2019 - Non-Small Cell Lung Cancer. In NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN GuidelinesV R). NCCN Evidence BlocksTM, Version 5.2019.

3.3 Approvazione agnostica dei TRK-inibitori e attuali indicazioni terapeutiche

Le fusioni dei geni *NTRK* sono state identificate in svariati tipi di tumore, sia pediatrici che dell'adulto, come mostrato in tabella 1 (1-14).

Tipo di tumore	Frequenza Fusioni NTRK (%)
Fibrosarcoma infantile	91-100
Nefroma mesoblastico congenito	83-92
Carcinoma mammario secretorio	92
Carcinoma secretorio della ghiandola salivare	100
Neoplasie spitzoidi	16
Carcinoma tiroideo	2.4-12
Gliomi di alto grado pediatrici	10
Tumori stromali gastrointestinali e del colon-retto	0.7-3.6
Adenocarcinoma polmonare	0.2-3.3



Glioblastoma	1.2
Sarcoma	1
Melanoma	0.3-0.5

Tabella 1. Frequenza delle Fusioni NTRK nei tumori solidi.

L'inibizione di NTRK si è dimostrata altamente efficace portando a risposte durature che sono state osservate indipendentemente dall'età del paziente, dal tessuto tumorale e dal partner del gene di fusione bloccando l'azione delle proteine TRK che favoriscono la diffusione e la crescita del tumore.

L'identificazione dei tumori portatori di questi riarrangiamenti genici è di fondamentale importanza per la selezione dei pazienti che possono beneficiare del trattamento con farmaci antitumorali, appartenenti alla famiglia degli inibitori della tirosin-chinasi, quali entrectinib e larotrectinib.

I pazienti eleggibili al trattamento dovrebbero quindi essere selezionati sulla base della presenza di una fusione genica *NTRK*.

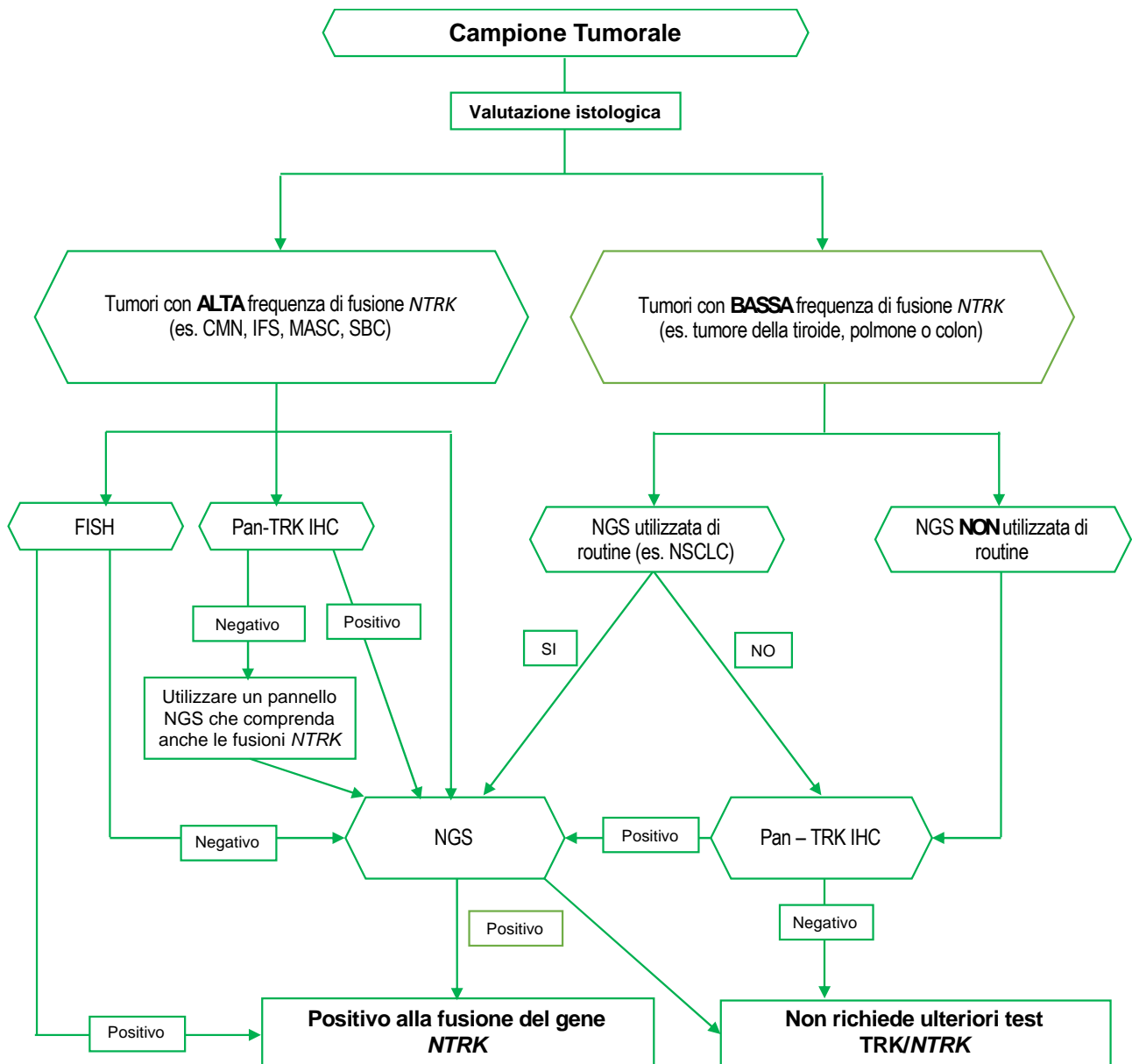



Figura 3. Penault-Llorca F, Rudzinski ER, Sepulveda AR. Testing algorithm for identification of patients with TRK fusion cancer. *J Clin Pathol.* 2019 May 09. doi: 10.1136/jclinpath-2018-205679

Una considerazione dovrebbe essere dedicata alla definizione della popolazione da testare. Al momento, non sono ancora state condotte analisi sistematiche di grandi coorti di pazienti affetti da tumore metastatico aventi la fusione dei geni *NTRK1/2/3*, pertanto, le caratteristiche fenotipiche dei tumori che ospitano geni di fusione *NTRK1/2/3* devono ancora essere completamente caratterizzate. Alcune linee guida, ed in particolare quelle della *National Comprehensive Cancer Network* sul NSCLC, hanno già incluso una raccomandazione per i test di fusione genica *NTRK* in pazienti con malattia metastatica (15, 16). Al di fuori di quei tipi di tumore in cui è noto che vi siano fusioni di *NTRK* con maggiore frequenza, per il momento si dovrebbe applicare un approccio più conservativo. Pertanto, la popolazione da testare dovrebbe essere rappresentata da "qualsiasi tumore



maligno in stadio avanzato, *wild type* (WT) per altre alterazioni genetiche conosciute e testate nella pratica di routine, specialmente se diagnosticato in giovani pazienti” (15).

Sta dunque emergendo un modello mutazionale, se pur con dati preliminari, che si fonda sulla mutazione genetica e quindi su un modello diverso dal modello istologico che fino ad ora ha governato la ricerca clinica, le decisioni regolatorie e la pratica oncologica. I nuovi farmaci oncologici del modello mutazionale possono avere un valore terapeutico aggiuntivo con particolare riferimento ai tumori rari e nei pazienti che hanno esaurito le linee di trattamento attuali.

Una questione annosa in Italia è rappresentata dalla possibilità prescrittiva, che necessita di importanti elementi di valutazione che devono essere integrati a livello nazionale con le procedure regolatorie e di rimborsabilità proprie di AIFA.

La gestione del risultato risulta complessa proprio per le possibilità applicative. Gli scenari possibili sono i seguenti:

- ✓ Il riscontro di farmaci oncologici attivi autorizzati e rimborsati in Italia, ma non per quella specifica sede del tumore, che implica un impiego *off-label*.
- ✓ farmaci oncologici o associazioni non autorizzati e rimborsati in Italia, ma autorizzati in altri Paesi.

Attualmente per gli inibitori di TRK (entrectinib e larotrectinib) è previsto l’uso compassionevole mediante *expanded access*.

In particolar modo larotrectinib in monoterapia è indicato per il trattamento di pazienti adulti e pediatrici affetti da tumori solidi che presentino una fusione dei geni *NTRK*, che abbiano una malattia localmente avanzata, metastatica oppure nel caso in cui la resezione chirurgica possa determinare una severa morbidità, e che non dispongano di opzioni terapeutiche soddisfacenti.

Entrectinib è indicato nel trattamento di tumori solidi localmente avanzati o metastatici positivi alla fusione di *NTRK* in pazienti adulti o pediatrici che hanno avuto una progressione della malattia a seguito di trattamenti precedenti o che non hanno opzioni terapeutici standard accettabili.

Per la gestione dei risultati, la discussione collegiale dei casi clinici di particolare complessità all’interno dei MTB costituisce un *repository* di grande rilevanza sull’epidemiologia delle mutazioni e della ricerca oncologica non solo all’interno di studi clinici (non sempre rappresentativi delle complesse situazioni cliniche dei Pazienti), ma anche nella attività clinica quotidiana (*Real World Evidence*, RWE).

Bibliografia

1. Argani P et al. “Detection of the ETV6-NTRK3 chimeric RNA of infantile fibrosarcoma/cellular congenital mesoblastic nephroma in paraffin-embedded tissue: application to challenging pediatric renal stromal tumors”. *Mod Pathol*. 2000;13(1):29-36.
2. Tognon C et al. “Expression of the ETV6-NTRK3 gene fusion as a primary event in human secretory breast carcinoma”. *Cancer Cell*. 2002;2(5):367-376.
3. Bishop JA et al. “Most nonpapillary “acinic cell carcinomas” represent mammary analogue secretory carcinomas”. *Am J Surg Pathol*. 2013;37(7):1053-1057.
4. Wiesner T et al. “Kinase fusions are frequent in Spitz tumors and spitzoid melanomas”. *Nat Commun*. 2014;5:3116.
5. Wu G et al. “The genomic landscape of diffuse intrinsic pontine glioma and pediatric non-brainstem high-grade glioma”. *Nat Genet*. 2014;46(5):444-450.

6. Stransky N et al: “The landscape of kinase fusions in cancer”. Nat Commun. 2014 Sep 10; 5:4846.
7. Brzeziańska E et al: “Molecular analysis of the RET and NTRK1 gene rearrangements in papillary thyroid carcinoma in the Polish population”. Mutat Res. 2006;599(1-2):26-35.
8. Iyama K et al: “Identification of Three Novel Fusion Oncogenes, SQSTM1/NTRK3, AFAP1L2/RET, and PPFIBP2/RET, in Thyroid Cancers of Young Patients in Fukushima”. Thyroid. 2017 Jun;27(6):811-818.
9. Lee SJ et al: “NTRK1 rearrangement in colorectal cancer patients: evidence for actionable target using patient-derived tumor cell line”. Oncotarget. 2015;6(36):39028-39035.
10. Vaishnavi A et al: “Oncogenic and drug sensitive NTRK1 rearrangements in lung cancer”. Nat Med. 2013 Nov;19(11):1469-1472.
11. Kim J et al: “NTRK1 Fusion in Glioblastoma Multiforme”. PLoS One. 2014 Mar 19;9(3): e9194
12. Wang L et al: “Identification of NTRK3 Fusions in Childhood Melanocytic Neoplasms”. J Mol Diagn. 2017 May; 19(3): 387–396.
13. Lezcano C et al: “Primary and metastatic melanoma with NTRK fusions” Am J Surg Pathol. 2018 Aug;42(8):1052-1058
14. Wu LW et al: “Durable Clinical Response to Larotrectinib in an Adolescent Patient with an Undifferentiated Sarcoma Harboring an STRN-NTRK2 Fusion”. JCO Precision Oncology – 2018 Aug 2
15. C, Marchiò et al: “ESMO recommendations on the standard methods to detect *NTRK* fusions in daily practice and clinical research” Annals of Oncology Volume 30, Issue 9, September 2019, Pages 1417-1427
16. National Comprehensive Cancer Network®/NCCN Guidelines Version 5.2019 - Non-Small Cell Lung Cancer NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®). NCCN Evidence Blocks™, Version 5 (2019)

4. Tumori con deficit dei meccanismi di riparazione attraverso ricombinazione omologa

I meccanismi che proteggono il DNA sono fondamentali per preservare l'integrità del genoma da lesioni prodotte da agenti ambientali o generate spontaneamente durante il metabolismo del DNA.

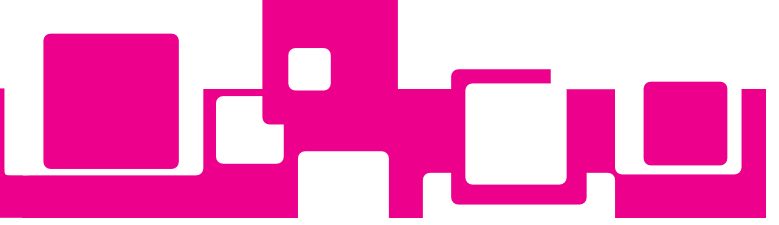
Le rotture del DNA a singolo filamento (SSB) sono riparate dai sistemi di *mismatch repair* (MMR), riparazione attraverso escissione di basi (BER) e riparazione di escissione nucleotidica (NER). I meccanismi di ricombinazione non omologa (NHEJ) o quelli di riparazione attraverso la ricombinazione omologa (HRR) riparano le rotture di DNA a doppio filamento (DSB).

HRR è un meccanismo privo di errori che ripristina la sequenza genomica del terminale di DNA rotto usando il cromatide come modello per la riparazione.

I tumori con deficit di HRR (HRD) sono stati descritti per la prima volta in tessuti portatori di mutazioni germinali dei geni oncosoppressori *BRCA1* e *BRCA2* (*BRCA1/2*). Tuttavia, eventi di tipo genetico ed epigenetico possono anche provocare l'inattivazione di altri componenti HRR, portando a HRD nei tumori sporadici.

Lo stato di HRD è presente in circa il 13% e il 15% dei tumori ovarici e mammari tripli negativi (TNBC), rispettivamente: tale stato è attribuibile alla presenza di mutazioni germinali in *BRCA1/2* (*gBRCA1/2*). Inoltre, il 50% e il 40% di neoplasie dell'ovaio e TNBC sono caratterizzati dalla presenza di HRD in assenza delle mutazioni *gBRCA1/2*. Inoltre, 10%–12% dei carcinomi prostatici avanzati è portatore di alterazione germinale o somatica inattivante di *BRCA2* e fino al 25% contiene un difetto di riparazione del DNA.


Inoltre, le cellule portatrici di mutazione in *BRCA1/2* sono sensibili alla chemioterapia al platino che genera *interstrand cross-link* (ICL) e agli inibitori PARP (PARPi): questi ultimi bloccano la



riparazione dell'SSB, favorendo accumulo di DSB carente di HRR e risultando in una impossibilità a riparare il DNA. Il PARPi intrappola anche la proteina PARP sul DNA causando lo stress di replicazione che è tossico in queste cellule. Sebbene siano stati approvati numerosi farmaci PARPi, la maggiore problematica in questo momento resta la definizione dello stato di HRD nelle pazienti *BRCA1/2-negative* ma che possono avere un fenotipo di tipo *BRCA-ness*. Diversi approcci sono attualmente in corso di studio per identificare i tumori *BRCA1/2* WT che possono beneficiare di agenti dannosi per il DNA e PARPi in base alla presenza di HRD. Tali approcci si basano su: a) *scores* che catturano le grandi genomiche aberrazioni, le cosiddette "cicatrici genomiche"; b) analisi delle firme mutazionali; c) mutazioni puntiformi identificate nei geni HRR usando pannelli di sequenziamento del DNA (1).

Nelle cellule mutante in *BRCA1/2*, gli "spread" cromosomici rivelano un aumento di riarrangiamenti cromosomici grossolani. Questo ha portato allo sviluppo di saggi per valutare le "Cicatrici genomiche" causate dalla perdita della funzione HRR utilizzando i dati derivanti dai metodi di SNP *array*. Due metodiche genomiche commerciali sono state testate per identificare i tumori con HRD negli studi clinici. Il saggio "*myChoice HRD*" di *Myriad*, che consiste nella valutazione della presenza di perdita di eterozigosi (LOH), squilibrio allelico telomerico (TAI) e stato delle transizioni su larga scala (LST) attraverso l'analisi del genoma. Il risultato di questo test determina uno "score HRD": un tumore con uno score HRD ≥ 42 è etichettato come positivo per HRD. "*Foundation Focus CDx BRCA LOH*" è progettato per rilevare invece la presenza delle mutazioni nei geni *BRCA1/2* e la percentuale di il genoma affetto da LOH nel DNA del tessuto tumorale su campioni di tessuto di pazienti con carcinoma ovarico. Secondo il test *Foundation Focus*, i tumori sono classificati come LOH-*high* se il punteggio è ≥ 16 . Le firme mutazionali (*signature*) sono segni caratteristici lasciati sul genoma del tumore per effetto di ciascun processo mutazionale: ad esempio, l'HRD è stato associato alla "firma 3" descritta da *Alexandrov et al* (2,3). La "*signature*" "3" è anche in grado di classificare con precisione le mutazioni missenso in *BRCA1/2* che hanno implicazioni funzionali ed è associata al silenziamento di *RAD51C* e *BRCA1* mediante metilazione del promotore. Quindi, sembra che le evidenze sperimentali derivanti da diversi trial clinici (in particolare ARIEL2, ARIEL3 e NOVA) rispetto all'utilizzo di tali marcatori delle cicatrici genomiche per quantificare dimostrino che lo stato di HRD abbia un impatto sul processo decisionale terapeutico. La principale domanda ancora aperta è però se le cicatrici genomiche siano biomarcatori predittivi di risposta ai sali di platino o PARPi, oltre alla presenza di mutazione in *BRCA1/2*. In realtà, sulla base di tali *trials* clinici, si può concludere che nella popolazione sensibile al platino le cicatrici genomiche dati da HRD forniscono informazioni in merito l'entità del beneficio clinico, data l'alta probabilità di risposta successiva alla sensibilità al platino. Infatti, l'entità del beneficio risulta maggiore tra coloro che sono HRD-positivi o *BRCA1/2*-mutati. Va sottolineato che, nella popolazione di pazienti con tumore ovarico, ulteriori indagini sono necessarie per verificare se un test HRD può essere utile per selezionare tumori resistenti al platino che possono beneficiare del PARPi o per identificare i *long responder* a PARPi e/o ai sali di platino. Nel tumore triplo negativo della mammella (TNBC), diversi studi hanno valutato se le cicatrici genomiche della HRD predicono la risposta ad agenti dannosi per il DNA o all'aggiunta di carboplatino alla chemioterapia standard, oltre la mutazione *BRCA1/2*.

Nel *setting* neoadiuvante, Telli *et al* hanno valutato retrospettivamente il valore predittivo del test



"myChoice HRD" in tre studi clinici per la terapia a base di platino. Pazienti con HRD-positivo hanno mostrato una probabilità maggiore di ottenere una risposta patologica completa o un residuo minimo malattia (RCB 0-I), dopo chemioterapia al platino anche tra i tumori *BRCA1/2* WT. Nello studio GeparSyxto, invece, tra tutti i pazienti con TNBC, l'aggiunta di carboplatino ha comportato un incremento marcato nei tassi di pCR nei tumori HRD positivi (da 33,9 a 63,5%, $P = 0,001$) e nei tumori HRD negativi (da 20 al 29,6%, $P = 0,399$). Sebbene con alcuni limiti di impostazione, in questo trial clinico, sulla base del test di interazione, HRD non ha dimostrato benefici per il carboplatino.

Altre osservazioni riguardanti il valore prognostico saranno necessarie, attraverso studi più robusti, per verificare se HRD determini un miglioramento di sopravvivenza libera da malattia (DFS) o sopravvivenza globale (OS).

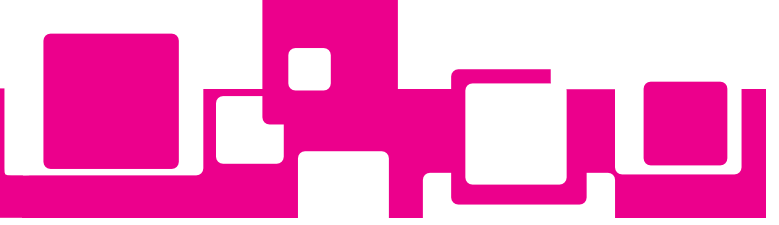
Vi sono ancora delle questioni aperte circa l'impiego di HRD nella pratica clinica: a) non sono disponibili dati di confronto dello stato HRD nel carcinoma mammario in fase iniziale e avanzata; b) sono necessari ulteriori studi per analizzare il ruolo del recupero della funzione HRR nel predire la resistenza al PARPi e ai sali di platino. Inoltre, nonostante gli studi OlympiAD ed EMBRACA abbiano dimostrato l'efficacia di PARPi nel carcinoma mammario metastatico con mutazione *BRCA1/2*, una porzione rilevante di pazienti non ha ancora risposto al trattamento. Pertanto, sarebbe necessario indagare se un test HRD possa aiutare a perfezionare i criteri di selezione di quel sottogruppo con maggiori probabilità di trarre beneficio dai PARPi (1).

Anche nei tumori prostatici i dati sono non sempre in accordo tra i diversi studi clinici. Tuttavia, il valore predittivo di altri difetti nei geni di riparazione del DNA (ad esempio *ATM*, *FANCA* o *CHEK2*) rimane ancora da validare in studi randomizzati. Nessuno dei test che determinano HRD-score è stato ancora validato negli studi clinici sul carcinoma della prostata. Va sottolineato come, in due recenti studi, la prevalenza di *signatures* di LOH elevate, basate sul test *FoundationOne*, tra il carcinoma della prostata con mutazione *BRCA2* era inferiore rispetto a quanto ritrovato nel carcinoma ovarico con mutazione *BRCA1/2*.

Un limite attuale dei test per la identificazione del *genomic scar* è l'impossibilità di catturare i processi di evoluzione del tumore, come il ripristino della funzione HRR in risposta alla pressione selettiva della terapia. In alternativa, potrebbe essere utile incorporare biomarcatori funzionali basati su test dinamici che valutano l'attività del *pathway* di riparazione del DNA.

Ci sono molti altri test attualmente utilizzati in ricerca per identificare i tumori con comportamento biologico simile a quello mutato con mutazione *BRCA1/2*. Tali test tengono conto non solo della variazione del numero di copie, ma anche dei profili di metilazione o di espressione genica. Anche se i dati pre-clinici e retrospettivi suggeriscono che questi test sono predittivi di risposta ad alte dosi di chemioterapia alchilante ed ai PARPi, la mancanza di validazione in studi prospettici e i limiti legati alla loro fattibilità su larga scala sembra essere un grosso problema che ne limita l'applicazione clinica.

I difetti di HRR nel carcinoma ovarico rilevati come identificativi per la terapia di mantenimento con PARPi dopo platino, lo *scar* genomico (HRD), nel carcinoma mammario in fase iniziale, ha mostrato un'elevata correlazione con danni al DNA e risposta chemioterapica garantendo un vantaggio nell'aggiunta del carboplatino; il carcinoma prostatico con mutazioni nei geni HRR, incluso *gBRCA2*, è sensibile al PARPi. Tuttavia, è considerato un limite importante il fatto che la



HRD sia osservata meno frequentemente rispetto ai tumori ovarici. Quindi, l'estensione del test HRD a tutte le neoplasie, in prospettiva futura, sebbene interessante sotto il profilo della speculazione scientifica, necessita però di attività di ricerca ulteriore per confermare la validità degli *score* proposti. Inoltre, il ruolo prognostico della HRD dovrebbe essere ulteriormente studiato con studi *ad hoc* al fine di riconoscere precocemente i pazienti con carcinoma mammario, candidati ai PARPi, per una strategia mirata. Al momento, il principale limite all'impiego in routine di HRD test è legato al fatto che tali test sono eseguiti esternamente, senza la possibilità di effettuare *in house* il test. Al di là degli aspetti legati ai costi di tali test, resta anche da stabilire quale strategia di rimborsabilità degli stessi si possa elaborare ai fini di consentire alle categorie di pazienti candidabili ai PARPi un accesso al farmaco in funzione dello stato HRD (1).

L'implementazione metodologica e l'armonizzazione dei processi analitici che sottendono la validazione di *scores* unici HRD tumore-dipendenti, sono ancora una sfida da superare in questo campo specifico della *targeted therapy*. Pertanto è auspicabile che si realizzi un test HRD accademico in grado di superare i limiti tecnologici e di costo legati all'impiego di tali marcatori genomici.

Bibliografia

1. Pellegrino B, Mateo J, Serra V, Balmaña J. Controversies in oncology: are genomic tests quantifying homologous recombination repair deficiency (HRD) useful for treatment decision making? ESMO Open 2019;4:e000480. doi:10.1136/esmoopen-2018-000480
2. Peng G, Chun-Jen Lin C, Mo W, *et al.* Genome-wide transcriptome profiling of homologous recombination DNA repair. Nat Commun 2014;
3. Polak P, Kim J, Braunstein LZ, *et al.* A mutational signature reveals alterations underlying deficient homologous recombination repair in breast cancer. Nat Genet 2017; 49:1476–86


5. Altri marcatori agnostici e Comprehensive genomic profiling

I marcatori agnostici rappresentano la nuova frontiera della medicina di precisione; oltre ai già citati MSI-H-MMR e TRK, all'orizzonte si stanno già profilando altri marcatori pan-tumoral, il cosiddetto *tumor mutational burden* (TMB), il carico mutazionale del tumore, che potrebbe aiutare a predire la risposta all'immunoterapia ed il *fibroblast growth factor receptor* (FGFR), che sembra giocare un ruolo in alcuni tumori delle vie biliari, del tratto gastro-intestinale, del polmone e della mammella.

All'ASCO di quest'anno sono quasi 200 gli *abstract* relativi a ricerche sul TMB, una trentina quelli sul FGFR e più di 130 quelli sul MSI.

Per quanto concerne il TMB diversi studi sottolineano come sebbene il riscontro di un TMB elevato sia predittivo di una maggiore risposta all'immunoterapia, questa corrispondenza varia molto in base all'istologia del tumore. Pertanto gli autori degli studi presentati all'ASCO 2020 e pubblicati, attualmente concludono che per definire il TMB un marcatore agnostico saranno necessari modelli predittivi più completi che integrino il TMB con altri fattori - inclusi marcatori genetici, immunologici e clinico-patologici - per poter ottenere un potenziale significato come *marker* agnostico nei pazienti trattati con immunoterapia (1,2).

I recettori del fattore di crescita dei fibroblasti (FGFR) regolano importanti processi biologici, tra cui



la proliferazione e la differenziazione cellulare. In considerazione della loro funzione, in condizioni fisiologiche l'attivazione di tali recettori e la conseguente cascata di *signaling* intracellulare è finemente regolata. L'attivazione aberrante di FGFR causata da mutazioni, riarrangiamenti e amplificazioni è coinvolta nella patogenesi del cancro, nel guidare la crescita tumorale, nel promuovere l'angiogenesi e nel conferire meccanismi di resistenza alle terapie antitumorali. In particolare, le mutazioni e i riarrangiamenti dell'*FGFR1-3* sono i più interessanti per la possibilità emersa di fungere da target per alcuni farmaci inibitori delle tirosinchinasi di nuovo sviluppo, tra cui pemigatinib, derazantinib e infigratinib.

Lo studio di Krook e colleghi ha valutato i campioni tumorali di oltre 270.000 pazienti testati con *comprehensive genomic profiling* di *Foundation Medicine*, con l'obiettivo di descrivere la frequenza e la tipologia delle alterazioni di *FGFR 1-3* in diversi tipi di tumori, e di trasdurre linee cellulari da studiare per saggi di potenzialità oncogenica e sensibilità delle alterazioni stesse all'inibizione farmacologica.


Il 2,3% dei tumori valutati ha dimostrato alterazioni (n=6314), di cui il 65% (n=4091) erano mutazioni e il 35% (n=2269) riarrangiamenti. I tipi di tumore con la più alta frequenza di alterazioni dell'*FGFR1-3* si sono dimostrati il carcinoma della vescica (17,9%), delle vie biliari intraepatiche (11,1%), dell'endometrio (7,9%) e i gliomi (5,5%). Nel gruppo maggioritario delle varianti brevi, si sono evidenziate 270 diverse alterazioni, di cui 144 mutazioni missense (la più frequente: *FGFR3* p.S249C, 18,3%) e 94 alterazioni troncanti, per lo più nell'esone 18. Tra i riarrangiamenti, sono state identificate 476 coppie uniche di riarrangiamento, di cui la più frequente si è dimostrata *FGFR3-TACC3* (29%).

Due sono gli aspetti da sottolineare. Il primo è che le patologie diverse esprimono alterazioni diverse in geni diversi: ad esempio, se nel tumore vescicale prevalgono le mutazioni di *FGFR3*, nel colangiocarcinoma prevalgono invece i riarrangiamenti di *FGFR2*. Il secondo aspetto rilevante è che le patologie a bassa frequenza di alterazione di *FGFR*, come il tumore mammario e polmonare, dimostrano, per la loro elevata prevalenza, un alto numero assoluto di pazienti con neoplasia *FGFR* alterata e quindi potenzialmente trattabili con farmaci FGFR inibitori. Tale evidenza rinforza la necessità di valutare con test di profilazione genica estesa la maggior parte di casi possibili, per identificare piccoli sottogruppi di pazienti candidati a ricevere terapie target (3).

Un altro marcatore agnostico in fase di sviluppo è *RET*. Il gene *RET* (*REarranged during Transfection*) è un proto-oncogene espresso esclusivamente nelle cellule di derivazione neuroectodermica (anche cellule C della tiroide), localizzato sul cromosoma 10, codifica per una proteina chinasi di superficie che funge da recettore per una serie di proteine della famiglia del GDNF (*fattore di crescita delle cellule gliali*). L'attivazione del recettore prevede la dimerizzazione, conseguita dopo il legame del recettore con il suo ligando preventivamente legato da un corecettore del tipo $GFR\alpha$. Il recettore Ret ha un dominio *CAL caderine-like* e un dominio ricco in cisteine nella porzione extracellulare, e due domini TK (tirosinchinasi) nel versante citoplasmatico (4,5).

Questo gene nella forma mutata *RET/PTC* è correlato all'insorgenza di alcune neoplasie. *RET/PTC* altro non è che un gene in cui *RET* si fonde con altri geni, questa fusione genera una proteina chimerica costitutivamente attiva.

I due principali geni *RET/PTC* sono *RET/PTC 1* e *RET/PTC 3*, correlati con tipi di cancro diversi.



RET/PTC 1 viene generato da un'inversione paracentrica (non include il centromero) sul cromosoma 10, che accosta due geni normalmente lontani tra loro, ossia *H4* e *RET*. Quest'ultima forma è correlata al tumore papillare della tiroide. Le fusioni geniche che coinvolgono *RET* si verificano in circa il 10% dei della carcinomi papillari della tiroide (PTC), il 2% dei NSCLC e una piccola parte di altre neoplasie maligne, mentre in circa il 60% dei carcinomi midollari della tiroide (MTC) si riscontrano mutazioni puntiformi attivanti *RET*, inclusi casi ereditari e sporadici (6,7).

All'ASCO 2018, Drilon ha fornito un quadro clinico più dettagliato di LOXO-292 (8), offrendo i dati dallo studio di fase I dei 61 pazienti valuta in risposta con tumori aventi alterazione del gene *RET*. Per i 30 pazienti con NSCLC, positivo per fusione *RET*, si è verificata una regressione del tumore, indipendentemente dal partner di fusione di *RET*, con un tasso di risposta globale (ORR) del 77% e con un altro 13% di pazienti con malattia stabile. Tra gli altri pazienti con fusioni *RET*, tutti i sette pazienti con PTC hanno risposto ed entrambi i pazienti con carcinoma del pancreas avevano una malattia stabile. Nella coorte MTC con mutazione *RET*, l'ORR in 22 pazienti era del 45%, con un altro 41% con malattia stabile. Solo due pazienti hanno manifestato eventi avversi gravi e gli altri effetti indesiderati sono stati per lo più benigni e rari.

In particolare, al momento dell'analisi dei dati, oltre il 90% dei partecipanti alla sperimentazione era in terapia, un indicatore del fatto che il controllo della malattia era durevole in molti casi.

I dati dello studio LOXO-292 si confrontano favorevolmente con i risultati intermedi della fase I di un altro agente bersaglio di *RET* in fase clinica precoce, ossia lo studio BLU-667 (*Blueprint Medicines*) (9). Come riportato all'ASCO, il farmaco era ben tollerato, con un ORR del 50% tra i pazienti con NSCLC e un ORR del 40% tra quelli con MTC.

Un approccio emergente per la biopsia liquida è l'impiego di piattaforme di ***comprehensive genome profiling (CGP)***, basate su tecnologie di NGS cui si è fatto precedentemente accenno.

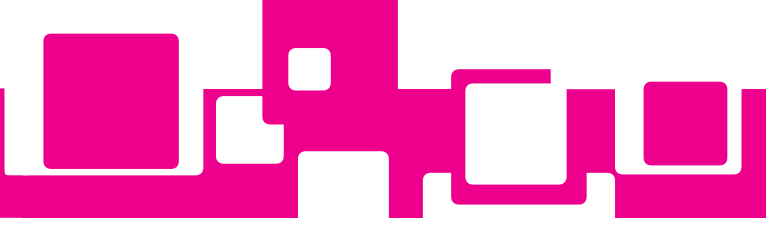
Il CGP ha in effetti rivoluzionato il trattamento dei tumori umani attraverso la possibilità che il trattamento possa venire pianificato su base tessuto agnostica ovvero sulla base di un biomarcatore per un target “*actionable*” prescindendo dal tessuto di origine della neoplasia ed in analogia alla sua attività come target specifico in particolari neoplasie. La presenza di un *target actionable* tessuto agnostico offre importanti prospettive di efficacia, ma in taluni il trattamento può risultare inefficace per le caratteristiche imprevedibili di evoluzione clonale della neoplasia.

In un recente studio sono stati correlati i dati di GCP e le caratteristiche ed *outcomes* clinici in 4064 pazienti con NSCLC. È stato possibile dimostrare la concordanza fra trattamento *targeted* personalizzato e beneficio clinico in OS e fra elevato TMB e beneficio in OS con immunoterapia.

Tale studio anche se non disegnato formalmente per la validazione in termini di utilità clinica, offre una *vision real world* che necessiterà ulteriori analisi di *cost-effectiveness* (10).

Le piattaforme di CGP possono essere basate oltre all' NGS includere altre tecnologie in grado di analizzare acidi nucleici estratti da materiale istologico ma anche da biopsia liquida (plasma o altri fluidi biologici).

La biopsia liquida con l'utilizzo di saggi di profilazione genomica è raccomandata dalle linee guida del *College of American Pathologists (CAP)* e dell'*International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC)*.



I vantaggi concettuali del CGP in biopsia liquida non si limitano alla semplicità di acquisizione del cfDNA ma anche della rappresentatività dell'intero *burden* tumorale in una dinamica longitudinale qualora si sospetti l'emergere di un nuovo *target*.

L'offerta commerciale di piattaforme di CGP in biopsia tissutale o in biopsia liquida deve essere considerata una grande opportunità. Emergono grosse criticità per il corretto impiego ed una adeguata accessibilità in un Sistema (come il nostro) universalistico. Nel referto vengono in genere presentate opzioni di impiego di farmaci sulla base dei dati molecolari o viene suggerita l'adesione a studi clinici. A parte ovviamente la necessità di garantire da parte delle singole Istituzioni adeguati *standard* etici, un *Molecular Tumor Board*, appare necessario per definire una linea di condotta per la rimborsabilità (un possibile percorso viene offerto dal Fondo AIFA 5%: vedi Raccomandazioni *Molecular Tumor Board*) e definire un Quadro normativo che identifichi le reali condizioni di impiego di CGP in biopsia liquida indicandone i needs di maggiore priorità quali malattie orfane, condizioni di refrattarietà alla prima linea di trattamento ecc. Appaiono quindi necessari studi di *cost-effectiveness* nel contesto nazionale considerando ovviamente il costo del trattamento.

Una grande opportunità ma da gestire nell'ambito di un Sistema controllato e sostenibile.

Per quanto detto finora, è evidente che lo scenario futuro in termini di ricerca e *real life* in oncologia sia destinato a cambiare. La profilazione genomica del DNA tumorale sarà la nuova carta d'identità della malattia. Questo, forse, cambierà completamente il modo in cui immaginiamo e classifichiamo le patologie aprendoci scenari sempre più complessi ed affascinanti.

Bibliografia

1. [Mark Lee](#) et al : "Tumor Mutational Burden as a Predictive Biomarker for Checkpoint Inhibitor Immunotherapy" *Hum Vaccin Immunother* 2020;16(1):112-115. doi: 10.1080/21645515.2019.1631136. Epub 2019 Jul 30.
2. Samstein RM et al : "Tumor mutational load predicts survival after immunotherapy across multiple cancer types." *Nat Genet.* 2019 Feb;51(2):202-206. doi: 10.1038/s41588-018-0312-8. Epub 2019 Jan 14. PMID: 30643254
3. Krook MA et al: "Pan-cancer analysis of FGFR1-3 genomic alterations to reveal a complex molecular landscape. "DOI: 10.1200/JCO.2020.38.15_suppl.3620 *Journal of Clinical Oncology* 38, no. 15_suppl (May 20, 2020) 3620-3620.
4. Honma Y, Kawano M, Kohsaka S, Ogawa M, *Axonal projections of mechanoreceptive dorsal root ganglion neurons depend on Ret*, in *Development*, vol. 137, n. 14, luglio 2010, pp. 2319–28, DOI:10.1242/dev.046995, PMID 20534675.
5. Uesaka T, Enomoto H, *Neural precursor death is central to the pathogenesis of intestinal aganglionosis in Ret hypomorphic mice*, in *J. Neurosci.*, vol. 30, n. 15, aprile 2010, pp. 5211–8, DOI:10.1523/JNEUROSCI.6244-09.2010, PMID 20392943.
6. Golden JP, Hoshi M, Nassar MA, et al., *RET signaling is required for survival and normal function of nonpeptidergic nociceptors*, in *J. Neurosci.*, vol. 30, n. 11, marzo 2010, pp. 3983–94, DOI:10.1523/JNEUROSCI.5930-09.2010, PMC 2850282, PMID 20237269.
7. Jain S, Knoten A, Hoshi M, et al., *Organotypic specificity of key RET adaptor-docking sites in the pathogenesis of neurocristopathies and renal malformations in mice*, in *J. Clin. Invest.*, vol. 120, n. 3, marzo 2010, pp. 778–90, DOI:10.1172/JCI41619, PMC 2827965, PMID 20160347.
8. LOXO-292, a selective and potent RET inhibitor, led to tumor shrinkage in *RET* fusion-positive and *RET*-mutant cancers alike, according to phase I data reported at the 2018 American Society of Clinical Oncology Annual Meeting
9. Clinical trial. Gov Identifier: NCT04204928 Pre-Approval Access Program (PAAP) for Pralsetinib (BLU-667) in Patients with Unresectable or Metastatic NSCLC or MTC
10. . Singal G, Miller PG, Agarwala V, Association of Patient Characteristics and Tumor Genomics With Clinical

6. Nuove tecnologie

Le nuove tecnologie applicabili alla valutazione dei marcatori agnostici si possono suddividere principalmente in due gruppi: tecniche di NGS e tecniche non NGS.

Le tecniche NGS si sono ormai affermate in maniera preponderante nella pratica clinica di routine, sono alla base di quasi tutti i *trials* clinici e sono diversi i kit d'analisi validati per utilizzo diagnostico disponibili in commercio. Il loro ruolo nella valutazione dell'instabilità dei microsatelliti e dei riarrangiamenti dei geni *NTRK1*, *NTRK2* ed *NTRK3* è già stato discusso nei capitoli precedenti pertanto in questa sezione non saranno trattati, mentre saranno esaminate le tecniche non NGS che potrebbero avere un utile impiego nella diagnostica dei marcatori agnostici.


A) Tecnologia NanoString nCounter

La tecnologia *NanoString nCounter* si basa su un metodo di ibridazione molecolare che consente di valutare in modo altamente sensibile e specifico l'espressione di più geni *target* contemporaneamente senza nessuno *step* di amplificazione o retrotrascrizione. In questo modo sono eliminati tutti quei *bias* e quegli artefatti legati ai processi di amplificazione che possono costituire un problema soprattutto quando l'RNA di partenza non è qualitativamente e quantitativamente ottimale. Questa metodica permette di analizzare un massimo di 800 target alla volta in 12 campioni diversi e di rilevare in condizioni ideali fino ad una copia di trascritto per cellula, usando come input una quantità di RNA totale pari a circa 100 ng (8).

Il sistema *NanoString nCounter* si basa sulla conta digitale diretta delle molecole di mRNA d'interesse, grazie all'utilizzo di due sonde specifiche per ogni target: una *reporter* che è marcata all'estremità 5' con una sequenza univoca di 6 fluorofori ed una *capture* che è biotinilata all'estremità 3' (Figura 1). In seguito ad un primo *step* di ibridazione tra molecole di mRNA *target* e sonde, dopo aver rimosso i reagenti in eccesso, i complessi formati vengono immobilizzati su una specifica cartuccia ricoperta di streptavidina, allineati per applicazione di un campo elettrico ed infine la cartuccia è scannerizzata da un lettore digitale. Dal momento che le sequenze dei fluorofori della sonda *reporter* sono specifiche per ogni *target*, il numero di segnali diversi rilevati corrisponderà al numero di molecole di mRNA *target* indagate presenti nel campione in esame. Prima di utilizzare il dato le conte grezze sono normalizzate usando un software di analisi accoppiato al sistema *NanoString*. Inizialmente viene rimosso il rumore di fondo, in seguito ogni campione è sottoposto ad una doppia normalizzazione: normalizzazione biologica sulla base delle conte dei geni di riferimento, scelti in maniera specifica per ogni pannello e per ogni applicazione; normalizzazione tecnica sulla base delle conte corrispondenti a controlli positivi presenti in ogni saggio in concentrazioni scalari, che consente di valutare la corretta esecuzione della metodica e l'assenza di artefatti tecnici.

La metodica è completamente automatizzata, il lavoro manuale richiesto è minore di 60 minuti e dall'estrazione dell'RNA al risultato intercorre un tempo medio di 2-3 giorni (9).

Oltre all'analisi dell'espressione genica e dei microRNA sono già disponibili, sebbene non validati per l'utilizzo diagnostico, dei pannelli *NanoString* d'interesse nel settore della medicina di



precisione volti a valutare geni di fusione, *copy number variations* e recentemente è stata sviluppata anche la cosiddetta *3D biology*.

La *3D biology* consente di analizzare contemporaneamente alterazioni a carico di DNA, RNA e proteine richiedendo una sezione di tessuto per la valutazione degli acidi nucleici e una per l'analisi di proteine. L'analisi di molecole target di DNA (variazioni a singolo nucleotide e InDels) ed RNA (espressione genica e geni di fusione) si basa sul sistema di sonde *capture* e *reporter*. L'analisi delle proteine invece richiede l'allestimento di una reazione immunoistochimica con anticorpi a cui sono legate delle sequenze di DNA sintetico univoche, recuperate per clivaggio tramite raggi UV in seguito al legame antigene-anticorpo. Tali sequenze saranno tanto più numerose quanto più è espressa la proteina in esame e la loro conta digitale viene effettuata usando sonde *capture* e *reporter* specifiche nella stessa seduta in cui si valutano alterazioni di DNA ed RNA. Pannelli *NanoString 3D biology* sono già disponibili per il tumore del polmone: consentono una caratterizzazione completa dei *target* d'interesse ma non ci sono ancora dati relativi all'applicazione di questa metodica su campioni della pratica clinica.

Oltre alla *3D biology* un'altra possibile e recente applicazione della tecnologia *NanoString* riguarda il *Digital Spatial Profiling* (DSP) che consente la valutazione spaziale di più proteine o molecole di RNA *target* direttamente sul tessuto d'interesse. Quest'approccio ha uno scopo simile a quello dei saggi *multiplex* di immunoistochimica e consente quindi di indagare *in situ* l'eterogeneità tumorale e l'interazione tumore- microambiente, spingendo potenzialmente l'analisi a livello di una sola o poche cellule. Il DSP si basa sull'utilizzo di *barcodes* oligonucleotidici coniugati con un *linker* fotoclivabile ad anticorpi primari o sonde di acidi nucleici complementari ai target in questione (10). In seguito al legame anticorpo-antigene o all'ibridazione delle sonde con molecole di mRNA, il *barcode* oligonucleotidico viene clivato con un laser UV indirizzato dal patologo nella regione tissutale d'interesse. Tipo e numero di *barcodes* vengono poi analizzati con sistema *NanoString* e le conte sono infine mappate in base alla localizzazione tissutale, consentendo una valutazione spaziale di tipo e quantità di target presenti nel campione. Riassumendo la metodica prevede tre fasi: colorazione del campione tramite tecniche di immunoistochimica e/o di ibridazione *in situ*, selezione specifica delle aree d'interesse e taglio con laser UV, analisi e raccolta dati. Sono stati sviluppati dei pannelli DSP che consentono l'analisi contemporanea di 40 proteine e 90 molecole di RNA target, il numero dei *target* analizzabili può essere ancora maggiore, ma la loro applicazione al momento è confinata al settore della ricerca (10).

Per quel che riguarda nello specifico la valutazione dei marcatori agnostici trattati in queste raccomandazioni sono riportati di seguito due brevi paragrafi uno su instabilità dei microsatelliti ed uno sulle fusioni dei geni *NTRK*.

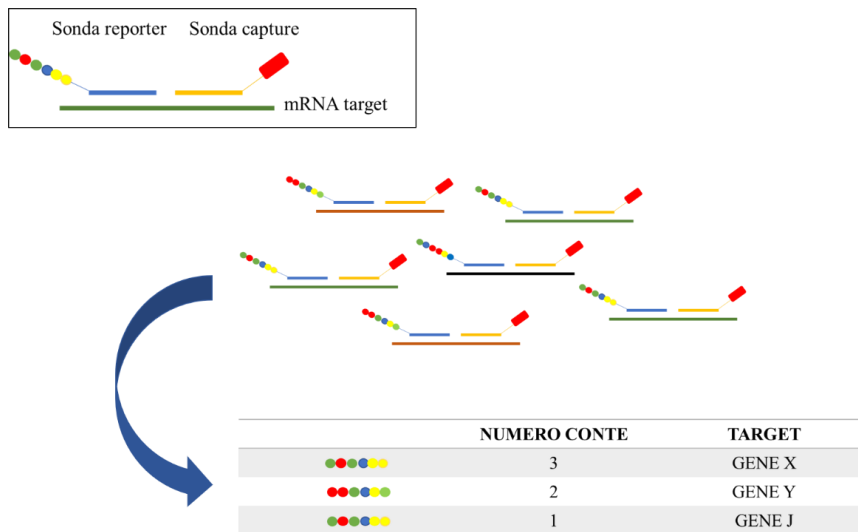



Figure 4: Rappresentazione schematica del principio di funzionamento del sistema NanoString nCounter.

➤ NanoString ed MSI

La risposta all'immunoterapia è associata sia ad antigenicità tumorale (*mismatch repair deficiency, tumor mutational burden*) che alla risposta immune adattativa antitumorale (*checkpoint* immunitari, presenza di infiltrato linfocitario). E' noto che questi fattori hanno potere predittivo indipendente ed è chiaro come la valutazione di entrambi possa migliorare la predizione della risposta (11). Non sempre tuttavia è possibile, per disponibilità del materiale biologico, costo dei saggi e tempistica, analizzare tutti i potenziali marcatori predittivi di risposta all'immunoterapia.

In questo contesto, il ruolo delle *gene signature* in diversi tumori solidi è già stato dimostrato ed è disponibile un pannello *NanoString* (*PanCancer Immuno-oncology 360 – IO360*), non ancora validato per uso diagnostico, che consente di valutare l'espressione di 770 geni utili per caratterizzare tumore, microambiente tumorale ed interazione tumore-sistema immunitario. Lo stesso pannello consente, con un appropriato algoritmo di analisi, di determinare una "*Tissue inflamed signature*" (TIS) con dimostrata valenza predittiva per l'immunoterapia (12).

In linea con quanto detto, Danahar e collaboratori hanno recentemente proposto degli algoritmi predittivi sulla base di profili di espressione genica misurabili con il pannello IO360 che oltre alla TIS consentono di valutare simultaneamente l'instabilità microsatellitare e di avere indicazioni indirette anche sullo status ipermutato o meno del tumore. In particolare, partendo dai *datasets* di *RNA sequencing* del TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) di tumori di colon, stomaco ed endometrio con elevata incidenza di instabilità dei microsatelliti, gli autori hanno sviluppato due algoritmi predittivi, uno basato sulla perdita di espressione dei geni *MLH1, MSH2, MSH6* e *PMS2*, che è risultata fortemente indicativa di instabilità dei microsatelliti e status di ipermutazione; l'altro basato sui livelli di espressione di 10 geni differenzialmente espressi nei tumori ipermutati. Il secondo algoritmo consente di individuare anche quei tumori ipermutati e/o con instabilità dei microsatelliti non correlati alla perdita di espressione di uno dei quattro geni del *mismatch repair*. L'efficacia predittiva di tali algoritmi e della loro combinazione è stata poi validata con il pannello *NanoString* IO360 su campioni di tumore del colon (52), dell'endometrio (11) e neuroendocrini (4) sia con che senza



instabilità dei microsatelliti confermata in immunohistochimica. La combinazione dei due algoritmi proposti ha dato un'accuratezza predittiva per quel che riguarda l'instabilità dei microsatelliti maggiore dell'88% ed una specificità del 100%. Inoltre, è stato ulteriormente ribadito come *inflamed signature* ed instabilità dei microsatelliti siano indipendenti.


Il vantaggio principale di questo approccio, rispetto ad altre tecniche di analisi di espressione genica, è che in poco tempo e partendo da una quantità di RNA pari a 100 ng è possibile avere contemporaneamente una stima sia dell'antigenicità tumorale sia dello stato di infiammazione del tumore. Tuttavia, va specificato che, oltre ai vantaggi tecnici della metodica, i sistemi di analisi necessitano di ulteriore validazione, messa a punto ed ottimizzazione prima di suggerirne un loro pieno utilizzo nella pratica clinica.

- **NanoString e geni di fusione:** la validità della tecnologia *NanoString* per l'analisi dei geni di fusione nei tumori solidi è stata dimostrata e comprovata soprattutto su campioni FFPE (13). Sebbene il disegno dei pannelli *NanoString* possa differire per il tipo di target inclusi, l'analisi si basa in generale su una duplice strategia: valutazione dello sbilanciamento del segnale delle sonde complementari alle estremità 3' e 5' del gene d'interesse, rilevabile solo in caso di fusione genica, ed utilizzo di sonde specifiche per le varianti di fusione note da esaminare. La valutazione dello sbilanciamento tra estremità 3' e 5' consente di valutare la presenza di fusione genica a prescindere dal partner specifico, pur non essendo possibile caratterizzare il tipo di variante. Questo approccio non richiede una conoscenza a priori del partner di fusione, è funzionale quando il gene indagato non è per niente espresso nel tessuto in questione in assenza di riarrangiamento, ma può dare problemi interpretativi in quei casi in cui invece il gene interessato ha un'espressione basale fisiologica nel tessuto in esame. La presenza di sonde fusioni specifiche supera quest'ultimo problema aumentando sensibilità e specificità del saggio, consentendo però solo l'analisi e l'individuazione di varianti note (14).

I dati disponibili relativi all'efficacia di tale approccio riguardano per lo più la valutazione di *ALK*, *ROS1* e *RET* nell'adenocarcinoma polmonare ed è sempre stata riportata un'ottima concordanza sia con l'ibridazione in situ fluorescente che con l'immunohistochimica, con un basso *failure rate* soprattutto su campioni FFPE; molti meno dati si hanno sull'applicazione di questa metodica su preparati citologici (14). Sebbene il *NanoString* richieda una quantità di RNA superiore a quella di alcuni pannelli NGS per l'analisi delle fusioni geniche (100-300 ng vs 10-100 ng), l'assenza di passaggi di retrotrascrizione ed amplificazione rende questa metodica meno sensibile alla scarsa qualità dell'RNA estratto da FFPE (15).

Ad oggi non ci sono pannelli *NanoString* validati per uso diagnostico che includano anche le fusioni dei geni *NTRK*, tuttavia sono disponibili dei pannelli commerciali che consentono di valutare alcune delle fusioni di *NTRK* ed ovviamente va considerata la possibilità di *customizzare* i pannelli in relazione alle esigenze di ogni laboratorio.

In conclusione, nell'ambito delle nuove tecnologie il sistema *NanoString nCounter* è attualmente in fase di studio e validazione per definire la sua eventuale introduzione nella pratica clinica. E' una tecnica che ha dato risultati sorprendenti in termini di sensibilità, specificità e riproducibilità del



dato, che richiede però elevati costi d'installazione e necessita dello sviluppo di adeguati software di analisi adatti alla routine.

La tecnologia *NanoString* ha il vantaggio di essere veloce ed automatizzata, non è una tecnica di *screening*, consente l'analisi solo di regioni note e rispetto alle tecnologie NGS sono pochi i dati disponibili riguardo alla sua applicazione su campioni clinici.

In conclusione, non è una tecnica antagonista alle metodiche di NGS perché basata su un principio differente, potrebbe, tuttavia, avere un importante ruolo complementare soprattutto in alcuni settori della medicina di precisione quale appunto l'immunoterapia.

B) Saggi di immunoistochimica multiplex

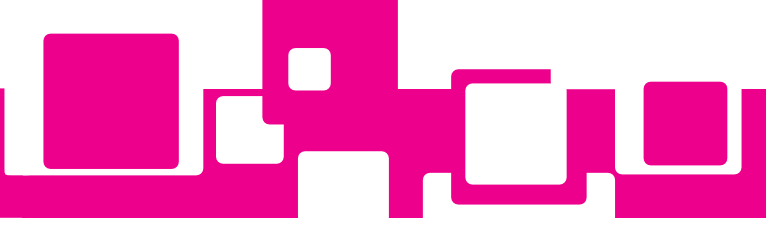
Annoverare le tecniche di immunoistochimica tra le nuove tecnologie può sembrare strano dal momento che i saggi di immunoistochimica fanno parte da anni degli algoritmi di analisi di diversi biomarcatori. Tuttavia, si assiste oggi ad un continuo sviluppo di nuove piattaforme e saggi di immunoistochimica *multiplex* come utile strumento per l'analisi simultanea di più proteine sulla stessa sezione di tessuto, consentendo di studiare le differenti popolazioni cellulari e la loro distribuzione spaziale nel tumore e nel relativo microambiente. Infatti, rispetto alle altre metodiche multiplex disponibili è l'unica che consente di valutare la disposizione spaziale dei vari biomarcatori.

Le piattaforme di immunoistochimica *multiplex* si possono dividere in tre gruppi principali: basate sull'utilizzo di cromogeni, basate sulla fluorescenza e basate sulla spettrometria di massa (alcuni esempi sono riportati nella tabella 2). Oltre che per il principio tecnico alla base di ogni metodo, le differenze principali riguardano il numero di marcatori che si possono analizzare simultaneamente (più elevato per le tecniche basate su fluorescenza o spettrometria di massa rispetto a quelle basate sui cromogeni), tempi di esecuzione, costi, sensibilità e specificità analitica. Per i dettagli tecnici, vantaggi e svantaggi delle varie metodiche e delle piattaforme disponibili si rimanda alla recente review di Parra e collaboratori (16). Ovviamente, le tecniche di immunoistochimica *multiplex* sono favorite dal rapido avanzamento tecnologico delle tecniche di acquisizione d'immagini e di analisi digitale che consentono una rilevazione più oggettiva di livelli di espressione dei marcatori in esame, co-localizzazione e compartimentalizzazione.

Ci sono già dati clinici disponibili sull'impiego di metodologie di questo tipo in alcuni tumori sia per la caratterizzazione del sottotipo tumorale sia nell'ambito della medicina predittiva (16,17). Ad esempio, sono stati suggeriti saggi di immunoistochimica multiplex per l'analisi simultanea di *pathways* correlati al tumore ed al suo microambiente per migliorare la stratificazione dei pazienti per l'immunoterapia (18).

Le tecniche di immunoistochimica multiplex necessitano di una fase pre-analitica accurata, di sistemi d'analisi digitale avanzati e ad oggi la disponibilità di anticorpi costituisce ancora un fattore limitante per alcune applicazioni.

Inoltre, sebbene con alcune metodiche si possano analizzare fino a 40-60 marcatori contemporaneamente, i sistemi di analisi digitale ad alta risoluzione necessari per tale analisi hanno costi elevati e probabilmente richiederanno ancora del tempo per la loro completa introduzione nella pratica clinica.



Per quel che riguarda la valutazione dei marcatori agnostici, è stato recentemente proposto dal gruppo del Professor Marchetti un sistema di *screening* economico e veloce per la valutazione dell'instabilità dei microsatelliti e dei riarrangiamenti dei geni *NTRK* basato sull'utilizzo di *Tissue Micro Arrays* (TMA) per i campioni istologici e *Tissue Slice Arrays* (TSA) per le piccole biopsie. E' stato dimostrato che usando TMA e TSA è possibile analizzare contemporaneamente circa 20 campioni diversi con un notevole risparmio economico, di materiale e di tempo soprattutto se si considera la rarità delle alterazioni indagate (19). Le tecniche di immunistochemica *multiplex* potrebbero incrementare ulteriormente il *throughput* di questo tipo di approccio dando la possibilità di analizzare più biomarcatori in più campioni nella stessa sezione di TMA o TSA.

Bisogna, però, sottolineare che le tecniche di immunistochemica *multiplex* necessitano ancora di attente ed approfondite analisi, sia per la standardizzazione dei processi pre-analitici ed analitici e la riduzione di eventuali artefatti ad essi correlati, sia per l'interpretazione dei risultati, non sempre chiara e lineare nemmeno agli occhi dei patologi più esperti e nemmeno con l'utilizzo di software di analisi d'immagine digitali avanzati.

METODI NON BASATI SULLA FLUORESCENZA

Si basano sull'utilizzo di cromogeni impiegati nell'immunistochemica convenzionale

- **Multiplexed immunohistochemical consecutive staining on a single slide (fino a 10 anticorpi per vetrino)**
- **Sequential immunoperoxidase labeling and erasing (fino a 5 anticorpi per vetrino, compatibile con anticorpi primari della stessa specie)**

METODI BASATI SULLA FLUORESCENZA

Tecniche di bleaching senza sistemi di amplificazione del segnale

- **MultiOmyx™ staining or hyperplexed Immunofluorescence Assay (fino a 60 marcatori per vetrino)**
- **Tissue-based cyclic immunofluorescence method (fino a 30 marcatori per vetrino)**

Amplificazione del rilevamento degli epitopi

- **Hapten-based modified multiplex (4 marcatori per vetrino, colorazione veloce di due ore)**
- **Tyramide signal amplification (7 anticorpi marcati per vetrino, compatibile con anticorpi primari della stessa specie)**

METODI BASATI SULLA SPETTROMETRIA DI MASSA

- **Secondary Ion Mass Spectrometry (altamente sensibile, però le particelle ionizzate distruggono la regione d'interesse dell'analisi e la disponibilità di anticorpi è attualmente uno dei limiti principali)**

➤ **Multiplexed ion beam imaging (simultanea marcatura di 40 anticorpi)**

Tabella 2: Metodi di immunoistochimica multiplex: esempi (16).

IN BREVE

- ✓ Le nuove tecnologie possono dividersi in NGS e non NGS.

- ✓ Le tecniche di NGS sono già integrate nella pratica di routine dei laboratori di patologia molecolare
 - diversi pannelli NGS validati per l'utilizzo diagnostico sono disponibili per la determinazione dell'instabilità dei microsatelliti e delle fusioni dei geni *NTRK*;
 - il tipo di pannello NGS va scelto in base ai marcatori inclusi, alla compatibilità con la qualità e la quantità di acidi nucleici ottenibili dai campioni in esame, ai livelli di sensibilità e specificità garantiti, al supporto bioinformatico richiesto, alla tempistica necessaria per l'analisi, ai costi e all'expertise del laboratorio

- ✓ Il sistema *NanoString nCounter* è vantaggioso principalmente per l'analisi dell'espressione genica
 - si basa su una conta diretta digitale delle molecole di mRNA *target*, non prevede passaggi di retrotrascrizione ed amplificazione ed è quindi idoneo all'analisi di campioni di RNA di scarsa qualità come quelli ottenuti da preparati FFPE;
 - è una metodica veloce ed automatizzata;
 - lo studio di alcuni profili di espressione genica può avere valenza predittiva di risposta all'immunoterapia
 - questa metodica è adatta anche allo studio dei geni di fusione
 - diverse applicazioni *NanoString* sono in fase di studio e validazione, ma ad oggi non ci sono pannelli validati per uso diagnostico nell'ambito della medicina predittiva

- ✓ I saggi di immunoistochimica multiplex consentono l'analisi simultanea di più proteine sulla stessa sezione di tessuto, consentendo di studiare le differenti popolazioni cellulari e la loro distribuzione spaziale nel tumore e nel relativo microambiente
 - richiedono tecniche di acquisizione d'immagine ed analisi digitale avanzate e costose al momento
 - richiedono accurata standardizzazione dei processi pre-analitici ed analitici
 - richiedono patologi esperti
 - la disponibilità di anticorpi per alcune applicazioni può essere un fattore limitante

Bibliografia

1. Kamps, R. *et al.* Next-Generation Sequencing in Oncology: Genetic Diagnosis, Risk Prediction and Cancer Classification. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 308 (2017).
2. Zhang, L., Peng, Y. & Peng, G. Mismatch repair-based stratification for immune checkpoint blockade therapy. *Am. J. Cancer Res.* **8**, 1977–1988 (2018).

3. Luchini, C. *et al.* ESMO recommendations on microsatellite instability testing for immunotherapy in cancer, and its relationship with PD-1/PD-L1 expression and tumour mutational burden: a systematic review-based approach. *Ann. Oncol.* **30**, 1232–1243 (2019).
4. Hsiao, S. J., Zehir, A., Sireci, A. N. & Aisner, D. L. Detection of Tumor NTRK Gene Fusions to Identify Patients Who May Benefit from Tyrosine Kinase (TRK) Inhibitor Therapy. *J. Mol. Diagn.* **21**, 553–571 (2019).
5. Solomon, J. P., Benayed, R., Hechtman, J. F. & Ladanyi, M. Identifying patients with NTRK fusion cancer. *Ann. Oncol.* **30**, viii16–viii22 (2019).
6. Penault-Llorca, F., Rudzinski, E. R. & Sepulveda, A. R. Testing algorithm for identification of patients with TRK fusion cancer. *J. Clin. Pathol.* **72**, 460–467 (2019).
7. Willis, J. *et al.* Validation of Microsatellite Instability Detection Using a Comprehensive Plasma-Based Genotyping Panel. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **25**, 7035–7045 (2019).
8. Kulkarni, M. M. Digital Multiplexed Gene Expression Analysis Using the NanoString nCounter System. in *Current Protocols in Molecular Biology* (eds. Ausubel, F. M. *et al.*) (John Wiley & Sons, Inc., 2011). doi:10.1002/0471142727.mb25b10s94.
9. Eastel, J. M. *et al.* Application of NanoString technologies in companion diagnostic development. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **19**, 591–598 (2019).
10. Decalf, J., Albert, M. L. & Ziai, J. New tools for pathology: a user’s review of a highly multiplexed method for *in situ* analysis of protein and RNA expression in tissue. *J. Pathol.* **247**, 650–661 (2019).
11. Danaher, P. *et al.* A gene expression assay for simultaneous measurement of microsatellite instability and anti-tumor immune activity. *J. Immunother. Cancer* **7**, (2019).
12. Ayers, M. *et al.* IFN- γ -related mRNA profile predicts clinical response to PD-1 blockade. *J. Clin. Invest.* **127**, 2930–2940 (2017).
13. Lira, M. E. *et al.* A Single-Tube Multiplexed Assay for Detecting ALK, ROS1, and RET Fusions in Lung Cancer. *J. Mol. Diagn.* **16**, 229–243 (2014).
14. Ali, G. *et al.* Analysis of Fusion Genes by NanoString System: A Role in Lung Cytology? *Arch. Pathol. Lab. Med.* **142**, 480–489 (2018).
15. Wong, D., Yip, S. & Sorensen, P. H. Methods for Identifying Patients with Tropomyosin Receptor Kinase (TRK) Fusion Cancer. *Pathol. Oncol. Res.* (2019) doi:10.1007/s12253-019-00685-2.
16. Parra, E., Francisco-Cruz, A. & Wistuba, I. State-of-the-Art of Profiling Immune Contexture in the Era of Multiplexed Staining and Digital Analysis to Study Paraffin Tumor Tissues. *Cancers* **11**, 247 (2019).
17. Hofman, P. *et al.* Multiplexed Immunohistochemistry for Molecular and Immune Profiling in Lung Cancer—Just About Ready for Prime-Time? *Cancers* **11**, 283 (2019).
18. Gibney, G. T., Weiner, L. M. & Atkins, M. B. Predictive biomarkers for checkpoint inhibitor-based immunotherapy. *Lancet Oncol.* **17**, e542–e551 (2016).
19. Marchetti, A., Di Lorito, A., Felicioni, L. & Buttitta, F. An innovative diagnostic strategy for the detection of rare molecular targets to select cancer patients for tumor-agnostic treatments. *Oncotarget* **10**, (2019).

Implementazione dei Molecular Tumor Board (MTB) e aspetti regolatori

Con l’obiettivo di discutere e gestire collegialmente la complessità di alcuni casi clinici, di comprendere i risultati dei test molecolari e di proporre la strategia terapeutica più adeguata sulla base dei farmaci attivi disponibili, l’istituzione dei *Molecular Tumor Board* costituisce oggi una priorità, così come riportato nelle nuove “Raccomandazioni AIOM 2020 Tumor Board Molecolare” a cui si rimanda per una trattazione completa dell’argomento e degli aspetti regolatori ad esso correlati.