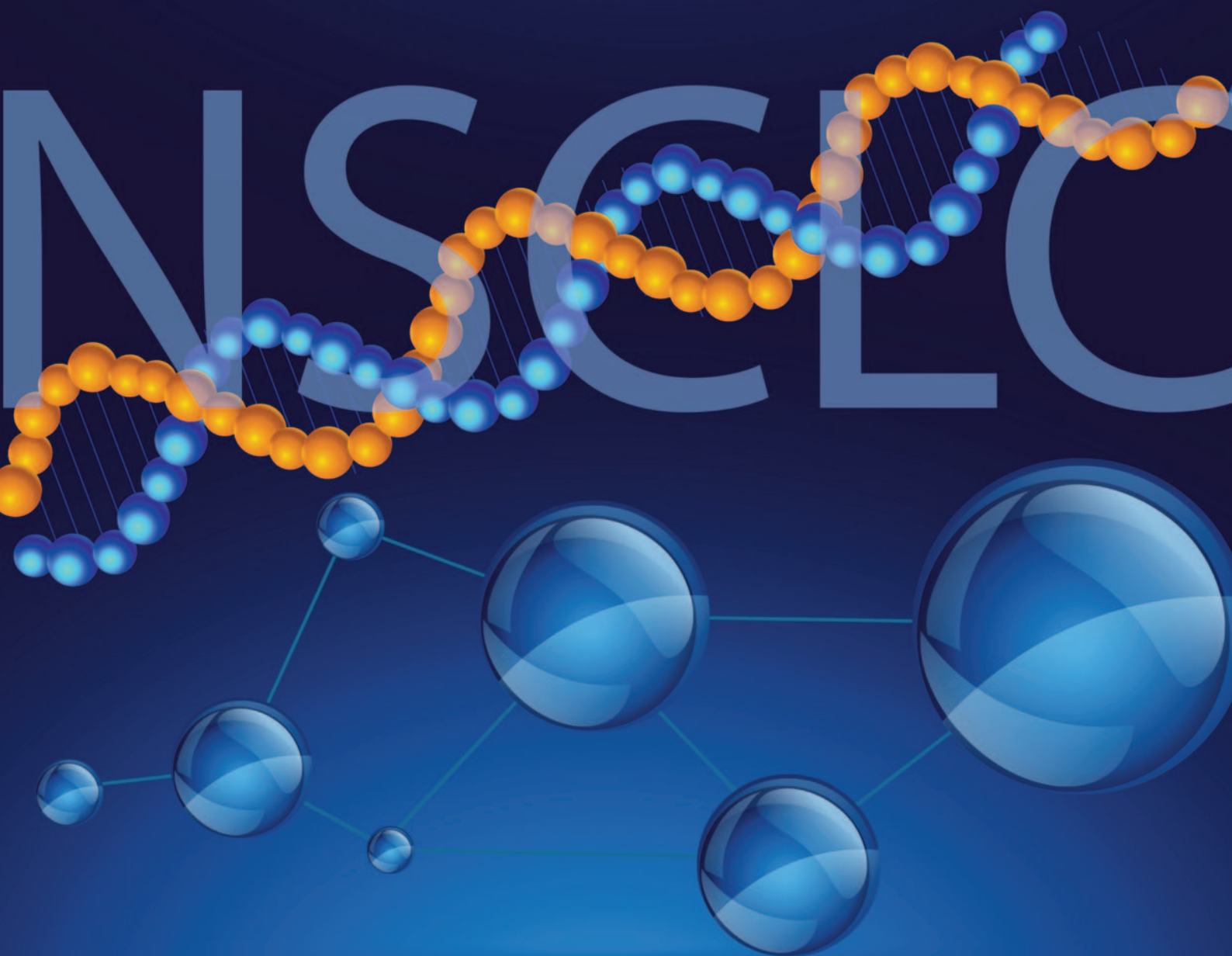




የኮሎምቢያ

**Raccomandazioni  
per la determinazione dell'espressione di PD-L1  
nel contesto dell'algoritmo diagnostico-molecolare  
per il paziente con NSCLC**





<b>INDICE</b>	<b>3</b>
<b>GRUPPO DI LAVORO</b>	<b>4</b>
<b>PREFAZIONE</b>	<b>5</b>
<b>Capitolo 1</b> <b>La diagnosi istopatologica/immunoistochimica:</b> <b>Il meglio con il minimo dispendio di materiale.</b>	<b>6</b>
<b>Capitolo 2</b> <b>L'algoritmo diagnostico-molecolare per la predittività di risposta ai farmaci</b>	<b>12</b>
<b>Capitolo 3</b> <b>La valutazione dei biomarcatori per i tumori "oncogene addicted": EGFR</b>	<b>18</b>
<b>Capitolo 4</b> <b>La valutazione dei biomarcatori per i tumori "oncogene addicted": ALK</b>	<b>22</b>
<b>Capitolo 5</b> <b>La valutazione dei biomarcatori per i tumori "oncogene addicted": ROS1</b>	<b>29</b>
<b>Capitolo 6</b> <b>La valutazione dei biomarcatori per i tumori "oncogene addicted": BRAF</b>	<b>33</b>
<b>Capitolo 7</b> <b>Il test PD-L1 per la selezione all'immunoterapia.</b> <b>Armonizzazione, cloni e cut-off.</b>	<b>37</b>
<b>Capitolo 8</b> <b>PD-L1 nella pratica clinica: criticità e accorgimenti per l'analisi.</b>	<b>41</b>
<b>Capitolo 9</b> <b>La Refertazione.</b>	<b>45</b>

## **GRUPPO DI LAVORO**

### **Dott. Mattia Barbareschi**

Ospedale S. Chiara, Trento

### **Dott. Massimo Barberis**

Istituto Europeo di Oncologia, Milano

### **Prof.ssa Fiamma Buttitta**

Università degli Studi G. D'Annunzio - Chieti

### **Dott. Claudio Doglioni**

Irccs San Raffaele, Roma

### **Prof.ssa Gabriella Fontanini**

Università degli Studi di Pisa

### **Prof. Renato Franco**

Università degli Studi di Napoli Federico II

### **Prof. Paolo Graziano**

Irccs Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo (FG)

### **Prof. Antonio Marchetti**

Università degli Studi G. D'Annunzio - Chieti

### **Prof. Mauro Papotti**

Università degli Studi di Torino

### **Dott. Giulio Rossi**

Ospedale Santa Maria Delle Croci, Ravenna

### **Prof. Giancarlo Troncone**

Università degli Studi di Napoli Federico II

## **PREFAZIONE**

L'introduzione dell'immunoterapia fra i trattamenti oncologici per i pazienti con carcinoma polmonare non-a piccole cellule (NSCLC) e del test immunoistochimico per valutare l'espressione di PD-L1 in funzione della selezione dei pazienti da destinare a farmaci anti-PD1/anti-PD-L1 ha modificato sostanzialmente l'algoritmo diagnostico-terapeutico standard in questa forma neoplastica.

Al momento attuale, a livello internazionale non sono disponibili linee guida laboratoristiche per una adeguata gestione dei percorsi diagnostici del paziente con NSCLC che includano anche la valutazione del biomarcatore PD-L1. Pertanto, si è pensato inizialmente di scrivere delle raccomandazioni sulla gestione del test IHC per la valutazione dell'espressione di PD-L1 nel NSCLC. Tuttavia, un serie di riflessioni con numerosi colleghi patologi ed oncologi ci ha indotto a ritenere che fosse più corretta ed utile una rivisitazione globale, ed aggiornata alle attuali necessità cliniche, di tutto l'algoritmo diagnostico-molecolare. Nascono così queste raccomandazioni che spaziano dal trattamento del tessuto, all'analisi morfologica/immunoistochimica, all'analisi molecolare dei marcatori indispensabili nella pratica clinica per la gestione del paziente, fino alla refertazione finale che nell'insieme sta diventando sempre più complessa.

Ringraziamo i numerosi colleghi appartenenti ai tre Gruppi di Studio SIAPEC di Patologia Molecolare e Medicina Predittiva (PMMP), Patologia Pleuro Polmonare (GIPP) e Immunoistochimica (GYM) che hanno partecipato alla stesura delle raccomandazioni. Ci auguriamo che il documento possa risultare utile ai patologi nella pratica clinica e rappresentare l'inizio di una fattiva collaborazione tra gruppi per la produzione di altri documenti similari.

Un caro saluto a tutti,

**Antonio Marchetti** *Coordinatore Gruppo di studio SIAPEC PMMP*

**Claudio Doglioni** *Coordinatore Gruppo di studio SIAPEC GYM*

**Giulio Rossi** *Coordinatore Gruppo di studio SIAPEC GIPP*

## Capitolo 1

# **La diagnosi istopatologica/immunoistochimica: Il meglio con il minimo dispendio di materiale.**

**M. Papotti, G. Rossi, M. Barbareschi, C. Doglioni**

---

Con la generica definizione di carcinoma non a piccole cellule (NSCLC) si è classicamente inteso raggruppare indistintamente tutte le neoplasie polmonari maligne che non fossero classificabili come lesioni neuroendocrine e alcuni rarissimi istotipi speciali. Tuttavia da tempo è emersa la inderogabile necessità di definire con la massima precisione possibile a quale linea differenziativa appartengono tali lesioni, cioè se alla linea squamocellulare o adenocarcinomatosa. Infatti, per le lesioni non operabili, da tale distinzione dipende la necessità per il patologo di integrare la diagnosi con una serie di ulteriori informazioni biomolecolari, la cui complessiva valutazione potrà aprire diversi iter terapeutici.

La precisa diagnosi istopatologica di tali neoplasie è quindi il primo e fondamentale evento dell'algoritmo diagnostico-molecolare indispensabile per la migliore cura del paziente. Tale algoritmo deve integrare al meglio una triade di informazioni, derivanti dalla presentazione clinica, dalla caratterizzazione morfologica e dalla caratterizzazione biomolecolare del tumore. Il patologo deve essere quindi nelle migliori condizioni per formulare una diagnosi integrata, che tenga conto di tali tre elementi.

Ciò prevede la disponibilità per il patologo di tutte le notizie anamnestiche e cliniche inerenti la classificazione clinico-patologica, in particolare le informazioni relative all'esposizione al fumo di tabacco e allo stadio della patologia neoplastica. Queste infatti condizionano quali procedure devono essere attuate sul materiale in esame. È importante sottolineare come sia del tutto differente il contesto diagnostico nelle condizioni in cui il paziente sia suscettibile di intervento chirurgico oppure sia ritenuto unicamente eleggibile a terapia medica. Infatti per i tumori polmonari in stadio 0-III resecabili chirurgicamente al momento è necessaria soltanto una attenta

valutazione cito-istologica convenzionale, con l'eventuale utilizzo di marcatori specifici per la definizione del profilo di differenziazione immunofenotipica per le lesioni poco differenziate. Tali informazioni sono necessarie e sufficienti per definire l'iter terapeutico, che per l'appunto è di tipo chirurgico. I tumori in stadio più avanzato, che non sono suscettibili di resezione chirurgica, sono oggetto di un ventaglio di terapie farmacologiche, la cui scelta dipende dalla analisi di una serie di marcatori predittivi di risposta terapeutica, a loro volta dipendenti dalla caratterizzazione morfologica stessa.

La caratterizzazione morfologica, in un opportuno contesto clinico di neoplasia polmonare primitiva, è di per sé sufficiente quando gli aspetti microscopici sono chiaramente indicativi della linea differenziativa, e in tal caso non è quindi necessaria la caratterizzazione della linea di differenziazione immunofenotipica. Occorre sottolineare che la caratterizzazione immunofenotipica di una tale lesione non solo non è necessaria, ma può essere talora potenzialmente anche fuorviante, se non interpretata correttamente nel giusto contesto clinico e con la accurata conoscenza delle potenziali "infedeltà" dei biomarcatori (1,2,3,4). Diversamente, nel caso in cui la neoplasia polmonare non abbia un'ovvia differenziazione ghiandolare o squamosa oppure vi sia la necessità di dirimere tra una lesione primitiva versus secondaria, si utilizzeranno alcune indagini immunoistochimiche, tenendo bene in considerazione da una parte il tipo di prelievo e la quantità di materiale neoplastico a disposizione, dall'altra le potenziali successive indagini predittive necessarie, al fine di ottimizzare l'uso di tessuto tumorale senza interferire con lo standard diagnostico.

Ciò è chiaramente molto più rilevante in caso di campioni citologici/biopsici in pazienti non operabili (oltre i due terzi dei casi), per i quali nella prima fase diagnostica il tessuto a disposizione è usualmente in limitata quantità.

La classificazione istopatologica del NSCLC segue le indicazioni della edizione 2015 dell'OMS (5), che riporta regole differenti in caso di campioni operatori e biopsie, e, nelle forme poco differenziate, prevede il ricorso alla determinazione di marcatori immunoistochimici di linea differenziativa. Numerosi sono i marcatori descritti in letteratura, che comprendono

p40/p63/citocheratine (CK) ad alto peso molecolare/desmocollina-3/SOX2 per la linea squamosa, TTF-1/napsina A/CK7 per l'adenocarcinoma, ed infine cromogranina/sinaptofisina/INSM1/CD56 per la linea neuroendocrina.

I casi di carcinoma poco differenziato vanno sempre analizzati con un pannello minimo di anticorpi primari che – una volta esclusa la possibilità di una neoplasia neuroendocrina in base alle caratteristiche morfologiche - prevede la ricerca di marcatori di origine ghiandolare o squamosa. In questi casi, è raccomandabile l'utilizzo di marcatori a localizzazione nucleare valutabili con maggiore oggettività, soprattutto su materiale bioptico/citologico, oppure in presenza di necrosi. Il pannello base di minima prevede l'utilizzo di TTF-1 (il clone 8G7G3 appare più specifico ma meno sensibile dei cloni SPT24 e SP141) e p40. Rispetto a p63, p40 (di cui rappresenta una variante di splicing) appare significativamente più specifica e con identica sensibilità. Mentre una focale positività per TTF-1 può risultare sufficiente nell'identificazione di adenocarcinoma, la reattività per p40 è indicativa di differenziazione squamosa se intensa e diffusa. In caso di reperti controversi (focalità dell'espressione, doppia negatività), va valutato nei singoli casi il vantaggio o meno di integrare il pannello di minima con altri marcatori, sempre in considerazione della necessità di conservare il materiale biologico per eseguire successive indagini immunologiche o molecolari predittive.

La diagnosi di istotipo mediante utilizzo di marcatori immunoistochimici dovrebbe riportare la seguente terminologia: "carcinoma polmonare scarsamente differenziato non-a piccole cellule con profilo immunofenotipico maggiormente indicativo di adenocarcinoma/carcinoma squamoso".

Su campione operatorio, un carcinoma scarsamente differenziato non-a piccole cellule con immunofenotipo controverso/nullo andrà diagnosticato come "carcinoma a grandi cellule scarsamente differenziato a fenotipo nullo". Su campione bioptico/citologico un carcinoma scarsamente differenziato non-a piccole cellule con immunofenotipo controverso/nullo andrà invece diagnosticato come "carcinoma polmonare non-a piccole cellule non ulteriormente caratterizzabile"

La valutazione dell'indice di proliferazione con Ki-67 non è prevista nella diagnosi di carcinoma non-a piccole cellule.

La caratterizzazione biomolecolare attualmente indispensabile per la corretta impostazione delle terapie specifiche per i tumori non operabili si basa sulla determinazione dell'espressione immunoistochimica di PD-L1 e sulla valutazione delle alterazioni di altri marcatori genetici (mutazioni di EGFR e BRAF e riarrangiamenti di ALK e ROS1). Tale caratterizzazione può essere potenzialmente effettuata su qualsiasi tipo di campione istologico (biopsia e pezzo operatorio da tumore primitivo o metastasi) ed anche su materiale citologico (agoaspirati con o senza guida ecografica/TAC, versamenti), purché il campione contenga una quantità di cellule tumorali vitali sufficiente per l'indagine richiesta. Non è stato definito un criterio assoluto per quantificare l'adeguatezza del materiale neoplastico, ma il reperto di 100 cellule tumorali vitali viene indicato come riferimento minimo per l'esecuzione e l'attendibilità di test molecolari nel NSCLC, in relazione anche alla sensibilità della metodica molecolare utilizzata.

Relativamente al materiale citologico, la disponibilità di cito-inclusi (piuttosto che di strisci o di citologia in fase liquida) è preferibile ed è spesso una condizione necessaria. La fissazione in formalina (piuttosto che in alcool o altri reagenti) appare essenziale perché la maggior parte dei test sono stati predisposti e validati su campioni così preservati. Procedure alternative non sono raccomandate e devono essere preventivamente validate nei singoli laboratori.

Andrebbero sempre evitati prelievi da tessuto osseo che, quando richiedono una fase di decalcificazione, precludono l'esecuzione di indagini molecolari. In questi casi, è importante stabilire con il collega che esegue il prelievo una comunicazione tempestiva per identificare il caso e cercare di evitare di decalcificare il materiale o disseccare la componente midollare contenente il tessuto neoplastico da porre in un biocassetta separata dalla componente ossea. Quest'ultima andrebbe comunque trattata con EDTA evitando soluzioni decalcificanti acide.

Dopo la fissazione dei campioni biotipici e dei cito-inclusi si possono delineare diverse procedure di gestione dei biomateriali. Una prevede, oltre alla preparazione delle sezioni per l'analisi

morfologica, l'immediato allestimento di sezioni per le successive potenziali indagini immunofenotipiche e molecolari. In alternativa è possibile preparare soltanto le sezioni in ematossilina-eosina, rimandando ad un momento successivo, in base alla presenza e quantità di cellule tumorali ed all'istotipo, la preparazione del materiale per indagini immunofenotipiche e predittive. Inoltre è opportuno che i vari biomateriali di un paziente siano valutati contestualmente: per esempio vi possono essere concomitanti campioni biotipici e citologici, e non è raro osservare casi in cui la citologia sia più ricca di materiale neoplastico che la biopsia; inoltre i diversi biomateriali possono essere utilizzati in modo integrato, utilizzando per esempio strisci convenzionali per l'estrazione di DNA, mentre le biopsie o i citoinclusi possono essere utilizzati per le altre indagini. La scelta fra le varie strategie di gestione dei campioni, è di particolare rilevanza per il rischio di esaurire lo scarso materiale tissutale/cellulare. Ad esempio, ripetuti sezionamenti al microtomo possono portare ad esaurimento dei campioni. Vi sono peraltro anche alcune criticità per l'allestimento simultaneo di multiple sezioni "in bianco": il numero di sezioni necessarie può essere dipendente dalla quantità di materiale tumorale presente, vi è un significativo maggiore carico di lavoro per il laboratorio, ed inoltre vi è la possibilità che l'intervallo di tempo tra allestimento del tessuto ed indagini molecolari/immunofenotipiche sia così protratto da determinare una riduzione della qualità del materiale in esame. Inoltre, tale procedura non dovrebbe essere effettuata per pazienti potenzialmente operabili, per i quali tale approccio non è necessario. L'opzione di allestire immediatamente sezioni "in bianco", all'atto della prima manipolazione dei blocchetti, può essere preferibile nei centri di riferimento diagnostico che eseguono in sede sia la diagnosi morfologica, sia le indagini predittive molecolari su richiesta dell'oncologo, mentre per le altre strutture appare consigliabile allestire le sezioni per i test predittivi solo nel momento di una specifica richiesta da parte dell'oncologo, con l'invio del tessuto allestito secondo procedure concordate con il centro di riferimento diagnostico. E' opportuno quindi che la scelta tra tali opzioni sia ben conosciuta e condivisa all'interno delle singole unità di Anatomia Patologica e sia discussa nei team multidisciplinari, ove presenti, e in ogni caso con gli Oncologi di riferimento per questa patologia.

In caso di materiale molto scarso in cui siano state comunque eseguite indagini istochimiche o

immunoistochimiche per determinare la diagnosi di istotipo, è possibile riutilizzare il materiale già colorato per ulteriori indagini molecolari.

Qualora la esecuzione di indagini biomolecolari comporti la distruzione completa del materiale diagnostico, per esempio di un preparato citologico per striscio, è necessario conservare documentazione fotografica del campione, possibilmente allegandola al referto diagnostico e integrandola nel sistema gestionale di reparto, chiedendo un apposito consenso al paziente

### Messaggi chiave

- L'algoritmo diagnostico per il carcinoma polmonare non tipo a piccole cellule prevede il riconoscimento della linea differenziativa ghiandolare, squamosa o neuroendocrina anche con l'uso di eventuali marcatori immunoistochimici.
- In caso di biopsie di neoplasie indifferenziate, la diagnosi finale indicherà "carcinoma a fenotipo nullo" e non è raccomandato procedere ad oltranza con le indagini diagnostiche, in quanto spesso (in assenza di successivo intervento chirurgico) il materiale prelevato sarà necessario per i test bio-molecolari
- La determinazione di marcatori immunofenotipici e/o molecolari è possibile anche su materiale biotico o citologico (soprattutto se è disponibile un cito-incluso/cell block), purché il campione contenga una quantità di cellule tumorali vitali sufficiente per l'indagine richiesta.

La determinazione di biomarcatori predittivi di risposta terapeutica può avvenire in simultanea al procedimento diagnostico, oppure dopo la definizione del tipo istologico ed in base al contesto clinico del paziente

### Bibliografia essenziale

Rossi G, Tiseo M, Cavazza A, Colby TV. Is immunohistochemistry always required to diagnose lung cancer? *Adv Anat Pathol*. 2013 Sep;20(5):327-33.

Yatabe Y, Dacic S, Borczuk AC, Warth A, Russell PA, Lantuejoul S, Beasley MB, Thunnissen E, Pelosi G, Rekhtman N, Bubendorf L, Mino-Kenudson M, Yoshida A, Geisinger KR, Noguchi M, Chirieac LR, Bolting J, Chung JH, Chou TY, Chen G, Poleri C, Lopez-Rios F, Papotti M, Sholl LM, Roden AC, Travis WD, Hirsch FR, Kerr KM, Tsao MS, Nicholson AG, Wistuba I, Moreira AL. Best Practices Recommendations for Diagnostic Immunohistochemistry in Lung Cancer. *J Thorac Oncol*. 2019 Mar;14(3):377-407.

Jain D, Nambirajan A, Borczuk A, Chen G, Minami Y, Moreira AL, Motoi N, Papotti M, Rekhtman N, Russell PA, Savic Prince S, Yatabe Y, Bubendorf L; IASLC Pathology Committee. Immunocytochemistry for predictive biomarker testing in lung cancer cytology. *Cancer Cytopathol*. 2019 May;127(5):325-339. doi: 10.1002/cncy.22137. Epub 2019 May 3.

Thunnissen E, Allen TC, Adam J, et al. Immunohistochemistry of Pulmonary Biomarkers: A Perspective From Members of the Pulmonary Pathology Society. *Arch Pathol Lab Med*. 2018;142:408-419.

Travis W, Brambilla E, Burke A, et al. WHO Classification of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. Lyon: IARC Press; 2015

## Capitolo 2

# L'algoritmo diagnostico-molecolare per la predittività di risposta ai farmaci

M. Barberis, A. Marchetti, G. Troncone

---

In molti centri ospedalieri caratterizzati dalla presenza di una attiva Oncologia Toracica impegnata nella terapia dei pazienti con NSCLC in stadio avanzato, si è sviluppata la necessità di accedere a servizi diagnostici in grado di formulare non solo una corretta diagnosi morfologica ma di caratterizzare i tumori a livello molecolare lavorando anche su piccoli campioni istologici e/o citologici. Vi è una disponibilità progressivamente crescente di nuovi farmaci che unitamente a quelli già presenti sul mercato possono talora essere usati in combinazione o sequenzialmente per inibire i meccanismi di resistenza. La attuale sfida per i Patologi è quella di andare oltre alla diagnosi, alla classificazione e alla stadiazione, per fornire informazioni utili all'indirizzo terapeutico in tempi clinicamente utili. In Italia, allo stato attuale per i pazienti con NSCLC in fase avanzata, è richiesta la valutazione dello stato mutazionale del gene EGFR, e delle fusioni dei geni ALK e ROS-1 per candidare i pazienti al trattamento con inibitori specifici tirosino-chinasici e della espressione immunocitochimica di PD-L1 per destinare i pazienti a trattamenti immunoterapici con inibitori dell'asse PD1/PD-L1. Tuttavia anche nel nostro paese sono attivi trial clinici con altri bersagli molecolari ed è possibile usare farmaci off-label o usufruire di extended-access a nuovi farmaci. I progressi della chimica farmaceutica e delle moderne tecnologie sono ovviamente più rapidi delle agenzie regolatorie e le linee guida più evolute tengono conto di questi cambiamenti.

Riportiamo nella tabella di seguito il recente endorsement di ASCO alle linee guida proposte da CAP/IASLC e AMP.

## Predictive biomarkers in NSCLC

### ASCO endorsement CAP/IASLC/AMP Molecular Testing Guidelines

- *EGFR*, *ALK*, *ROS1* and ***BRAF*** testing should be performed on all patients with advanced lung adenocarcinoma, irrespective of clinical characteristics.
- Physicians may use molecular biomarker testing in tumors with:
  - a. an adenocarcinoma component;
  - b. non-squamous non-small-cell histology.

Kulerrkenian et al. J Clin Oncol. 2018 Mar 20;36(9):911-919

L'inserimento della valutazione dello stato di BRAF nell'algoritmo diagnostico per il NSCLC è stato suggerito dalla dimostrazione che la mutazione p.V600E è predittiva di risposta a dabrafenib e trametinib, con tassi di risposta superiori al 60% (Planchard et al. Lancet Oncol 2017; 18: 1307–16). Pertanto, le mutazioni V600 di BRAF, per quanto rare (1-2% degli adenocarcinomi) devono essere analizzate, visto che i farmaci sono già disponibili per pazienti affetti da melanoma metastatico con mutazione di BRAF.

Nel caso in cui sia possibile inserire il paziente in trials clinici, anche le valutazioni dello stato di altri geni come MET (exon 14 skipping e amplificazione), RET (ri-arrangiamento e mutazione), HER2 (amplificazione e mutazione) possono essere richieste. Pertanto un centro di riferimento diagnostico deve essere in grado di poter venire incontro a queste ulteriori esigenze. Nella tabella seguente riportiamo quanto oggi dovrebbe essere prodotto per potere offrire a un paziente con NSCLC avanzato le migliori possibilità di cura.

Per affrontare una diagnostica complessa avendo come campione biologico una piccola biopsia o un cito-incluso è necessario ottimizzare il materiale ottenendo sezioni seriate attraverso un protocollo dedicato. Si consiglia di allestire 15-20 sezioni consecutive montate su vetrini con carica elettrostatica e di colorare il primo e l'ultimo vetrino con Ematossilina-Eosina. In questo modo si evitano perdite di materiale ed è possibile destinare le sezioni alle diverse indagini (biomarcatori diagnostici e predittivi). Ad oggi lo stato di ALK può essere valutato anche con una semplice colorazione immunocitochimica (preferibilmente con il test sviluppato per la diagnostica in vitro,

basato sul clone D5F3, Ventana) mentre per ROS1 l'immunocolorazione, con clone D4D6 (Cell Signalling) o SP324 (Ventana, a breve disponibile) serve egregiamente come screening, ma i casi positivi vanno confermati in FISH.

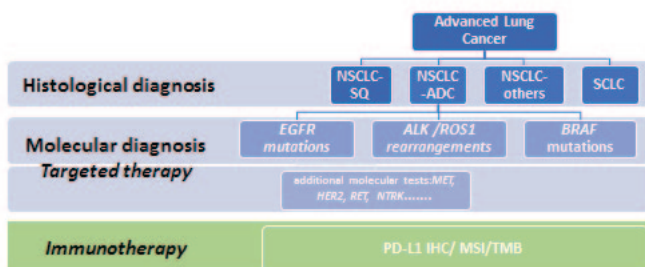
Inoltre è opportuno sottolineare come gli approcci multimarker consentano di interrogare molti geni nella stessa seduta analitica e valutare l'assetto mutazionale, la variazione del numero di copie e la presenza di geni di fusione risparmiando materiale, tempo e denaro.

Se la richiesta clinica si limita alla determinazione dello stato di EGFR, ALK, ROS1 le tecniche immunocitochimiche associate a FISH e a real-time PCR forniscono risultati tecnicamente soddisfacenti, ma impongono il sacrificio di quantità maggiori di acidi nucleici e rendono talora impossibili ulteriori valutazioni predittive.

La qualità del campione è funzione di due parametri: la quantità di cellule tumorali presenti (mai inferiore al 20%) e la qualità degli estratti che deve essere valutata preferibilmente con tecniche fluorimetriche.

Accanto all'analisi molecolare è necessario generare informazioni sulla espressione immunocitochimica di PD-L1 per candidare i pazienti a immunoterapia. La tabella seguente rappresenta schematicamente le necessità diagnostiche attuali e dell'immediato futuro.

### Diagnostic Algorithm



Gli inibitori dei checkpoint immunitari (ICI) sono stati inseriti nelle strategie di trattamento dei NSCLC avanzati in prima e seconda linea migliorando la prognosi per questi pazienti. Tuttavia

l'approccio terapeutico era già stato modificato dall'avvento delle terapie a bersaglio molecolare nei pazienti con NSCLC con mutazioni driver (cosiddetti tumori oncogene-addicted). Nonostante gli ICI rappresentino un trattamento innovativo e attivo per un ampio spettro di NSCLC avanzati, l'efficacia degli ICI nell'algoritmo terapeutico dei tumori "oncogenic-addicted" resta da dimostrare.

I Patologi devono inserire la valutazione dell'espressione di PD-L1 integrandola nell'algoritmo diagnostico molecolare. Va quindi tenuto conto della possibilità che NSCLC "oncogene-addicted" possano esprimere PD-L1. In questo caso, l'iper-espressione di PD-L1 non deve automaticamente candidare agli ICI pazienti che non ne potrebbero beneficiare perché i loro tumori possono essere efficacemente trattati da inibitori della tirosina chinasi. Recentemente è stato riportato come l'iperespressione di PD-L1 con TPS ( Tumor Proportion Score) > del 50% delle cellule tumorali si possa osservare in tumori riarrangiati per ROS1.

Anche se con minore frequenza la stessa cosa è stata riportata in tumori con riarrangiamento di ALK.

L'importanza di uno studio molecolare esaustivo è stata ribadita da un report relativo a due pazienti con NSCLC con mutazione di MET-exon 14 skipping- e alta espressione di PD-L1 che non hanno risposto a pembrolizumab.

L'espressione di PD-L1 in pazienti con mutazione di EGFR è molto variabile, ma è in genere non superiore al 50%.

La valutazione del carico mutazione per megabase ( Tumor Mutation Load o burden) non è al momento pratica clinica e quindi non verrà trattata in questa sede.

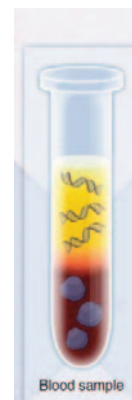
Uno degli argomenti maggiormente dibattuti e estremamente promettente è quello dell'impiego della cosiddetta biopsia liquida nel monitoraggio dei NSCLC avanzati. I bersagli principali di questa tecnica sono le cellule tumorali circolanti, il DNA tumorale circolante e le vescicole esosomiali.

Molto si è parlato e scritto, a proposito e a sproposito, di questa tecnica, tanto è vero che ASCO ha recentemente ridimensionato le aspettative riguardanti l'uso su vasta scala della liquid biopsy come riportato nella tabella seguente

# Molecular pathology in NSCLC

## ASCO endorsement CAP/IASLC/AMP Molecular Testing Guidelines

- In some clinical settings in which tissue is limited and/or insufficient for molecular testing, physicians may use a plasma cfDNA assay to identify *EGFR* mutations
- Physicians may use plasma cfDNA methods to identify *EGFR* T790M mutations in patients with lung adenocarcinoma with progression or secondary clinical resistance to *EGFR* targeted TKIs; testing of the tumor sample is recommended if the plasma result is negative



*Kalemkerian et al. J Clin Oncol. 2018 Mar 20;36(9):911-919*

Come Patologi siamo consapevoli che oggi le biopsie diagnostiche possono rispondere a queste domande:- Quali mutazioni guidano la progressione della malattia? Quali ulteriori alterazioni geniche sono responsabili della insorgenza di fenomeni di resistenza? Quali alterazioni geniche sono responsabili di una resistenza secondaria insorta?

Dobbiamo ammettere che le biopsie tradizionali possono esporre i pazienti al rischio di sanguinamenti e/o di infezioni, che le biopsie possono non essere rappresentative dello stato dell'intera neoplasia, considerata la sua costante eterogeneità. Inoltre, specialmente in pazienti anziani con co-morbidità o in situazioni di difficile accesso biotico, non sempre la biopsia è facilmente eseguibile.

Anche se FDA ha approvato la liquid biopsy solo per la ricerca di mutazioni di *EGFR* in pazienti con NSCLC in cui non sia possibile disporre di campioni biotici oppure di ricercare la presenza di mutazioni di resistenza a inibitori di tirosina chinasi di prima o seconda generazione, numerosi test diagnostici sviluppati sia in ambiente accademico che industriale sono attualmente disponibili. Il paradigma dell'assay potrebbe essere riassunto nella seguente affermazione: se l'assay fornisce un risultato positivo, vale a dire rivela presenza di una mutazione "actionable", si può iniziare una terapia specifica; se invece il test è negativo dobbiamo considerare due possibilità: o il target non

è presente, oppure la quantità di DNA tumorale è così scarsa che non può essere rilevata; in questo caso l'assay può essere considerato falsamente negativo. Ciò induce a ripetere l'esame su campioni tissutali o citologici.

### Messaggi chiave

- Rispettare rigorosamente i parametri di adeguatezza del campione
- Valutare l'espressione di PD-L1 nel contesto di un algoritmo diagnostico completo
- Ricordare che un TPS superiore al 50% in presenza di un driver druggable in prima diagnosi (EGFR,ALK,ROS1) impone una terapia targeted

### Bibliografia essenziale

Kalemkerian GP, Narula N, Kennedy EB, Biermann WA, Donington J, Leighl NB, Lew M, Pantelas J, Ramalingam SS, Reck M, Saqi A, Simoff M, Singh N, Sundaram B. Molecular Testing Guideline for the Selection of Patients With Lung Cancer for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: American Society of Clinical Oncology Endorsement of the College of American Pathologists/International Association for the Study of Lung Cancer/Association for Molecular Pathology Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol*. 2018 Mar 20;36(9):911-919.

Planchard D, Smit EF, Groen HJM, Mazieres J, Besse B, Helland Å, Giannone V, D'Amelio AM Jr, Zhang P, Mookerjee B, Johnson BE. Dabrafenib plus trametinib in patients with previously untreated BRAFV600E-mutant metastatic non-small-cell lung cancer: an open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2017 Oct;18(10):1307-1316

Lee J, Park CK, Yoon HK, Sa YJ, Woo IS, Kim HR, Kim SY, Kim TJ. PD-L1 expression in ROS1-rearranged non-small cell lung cancer: A study using simultaneous genotypic screening of EGFR, ALK, and ROS1. *Thorac Cancer*. 2019 Jan;10(1):103-110

Evans M, O'Sullivan B, Hughes F, Mullis T, Smith M, Trim N, Taniere P. The Clinicopathological and Molecular Associations of PD-L1 Expression in Non-small Cell Lung Cancer: Analysis of a Series of 10,005 Cases Tested with the 22C3 Assay. *Pathol Oncol Res*. 2018 Sep 17.

Baba K, Tanaka H, Sakamoto H, Shiratori T, Tsuchiya J, Ishioka Y, Itoga M, Taima K, Tasaka S. Efficacy of pembrolizumab for patients with both high PD-L1 expression and an MET exon 14 skipping mutation: A case report. *Thorac Cancer*. 2019 Feb;10(2):369-372

## Capitolo 3

# La valutazione dei biomarcatori per i tumori “oncogene addicted”: EGFR

G. Troncione, M. Barberis, F. Buttitta

---

In pazienti con adenocarcinoma polmonare in fase avanzata di malattia, le mutazioni somatiche attivanti il gene EGFR conferiscono sensibilità al trattamento di prima linea con piccole molecole ATP mimetiche inibitrici della attività tirosino-chinasica (TKI), di prima (erlotinib e gefitinib) e di seconda generazione (afatinib). Tale strategia terapeutica conferisce miglioramenti sostanziali rispetto alla chemioterapia, in termini di sopravvivenza libera da malattia (PFS) e qualità di vita. Più recentemente, è stato introdotto nella pratica clinica un TKI di terza generazione (osimertinib) con il vantaggio di una maggiore selettività e una migliore tollerabilità, con una penetrazione cerebrale ottimizzata. In particolare l'osimertinib ha dimostrato di prolungare ulteriormente la PFS e ritardare lo sviluppo della resistenza al trattamento.

Il test per la valutazione dello stato mutazionale di EGFR è indicato in tutti i pazienti con adenocarcinoma polmonare in stadio IIIb-IV. Va eseguito indifferentemente sul tumore primitivo o sulle lesioni metastatiche, indipendentemente dal sesso, abitudine al fumo ed al grado di differenziazione della neoplasia. In pazienti giovani e non fumatori, il test EGFR può essere effettuato anche su carcinomi squamosi e carcinomi indifferenziati a cellule piccole, soprattutto quando una piccola biopsia od un citologico, non escludono la possibilità che il tumore comprenda anche una componente di adenocarcinoma. Idealmente, il test EGFR in base alle risorse a disposizione ed alle priorità stabilite dal gruppo multidisciplinare di ciascuna realtà locale, potrebbe essere effettuato anche al momento della diagnosi (“reflex testing”) sul tessuto tumorale di pazienti in stadio I, II, e III. Tuttavia, i pazienti così selezionati in questi stadi, alla data attuale non potrebbero beneficiare di alcun trattamento. Un punto critico riguarda i tempi di refertazione dei test, che devono prevedere non più di 2 settimane (10 giorni lavorativi) dal momento della richiesta dell'oncologo. E' chiaro che ogni sforzo deve essere speso al fine di recuperare rapidamente l'inclusione in paraffina o il preparato citologico d'archivio, in modo che il laboratorio di analisi

abbia a disposizione il campione entro tre giorni dalla richiesta.

Il test può essere eseguito sia su campioni istologici, bioptici od operatori fissati in formalina ed inclusi in paraffina, che su preparati citologici. Questi ultimi possono essere sia citoinclusi che preparati colorati con i metodi Papanicolaou o May Grunwald Giemsa. A prescindere dalla tipologia del preparato, il Patologo deve selezionare e tracciare la percentuale della componente neoplastica, cercando per quanto possibile di assicurarne la massima concentrazione/densità cellulare e l'assenza di possibili contaminanti, quali il muco, evitando aree necrotiche e non vitali.

Il test mutazionale EGFR deve ricercare tutte le mutazioni attivanti che sono state descritte negli esoni 18-21, con una frequenza pari all'1%. E' bene ricordare che le delezioni "in frame" dell'esone 19 e la mutazione puntiforme L858R dell'esone 21, comprendono il 90% di tutte le mutazioni del gene. Tra le delezioni quelle più frequenti prevedono la perdita di 15-18 coppie di basi. Altre mutazioni puntiformi comprendono quelle dell'esone 18 (E709 e G719) e la mutazione L861Q dell'esone 21. Le inserzioni nell'esone 20 e la mutazione T790M sono associate alla resistenza intrinseca o acquisita al trattamento con i TKI di prima e seconda generazione. Le mutazioni attivanti hanno una distribuzione omogenea nel tessuto neoplastico; al contrario le mutazioni inducenti resistenza acquisita vengono selezionate durante il trattamento anti-EGFR. Per identificare specificamente i cloni resistenti è necessario l'utilizzo di metodiche ad elevata sensibilità, capaci di identificare <5% di alleli mutati.

Le metodologie di indagine di screening od a bersaglio mutazionale sono varie. Le tecniche di screening evidenziano mutazioni note e non note. Tra queste le tecnologie di ("dHPLC (Denaturing high performance liquid chromatography") e di HRMA ("High Resolution Melting Analysis"), discriminano genericamente tra DNA mutato e wild-type, senza specificare con precisione l'alterazione nucleotidica, che invece può essere identificata dalle metodiche di sequenziamento diretto secondo Sanger o di pirosequenziamento, tecniche che tuttavia presentano una sensibilità limitata.

I metodi cosiddetti targeted od a bersaglio mutazionale, permettono la diagnosi di mutazioni note

con elevata sensibilità e sono per lo più basati sull'impiego della tecnologia di Real Time PCR. Ne sono esempi i kit Therascreen EGFR RGQ PCR, Cobas® EGFR Mutation Test e il PNAclamp™ EGFR Mutation. Più recente è l'Idylla™ EGFR Mutation Test rapido e completamente automatizzato.

La necessità di saggiare altri biomarcatori, quali ALK, ROS1 e BRAF ha portato alla implementazione di tecnologie multimarker. Accanto a metodiche "multiplex" di Real Time PCR e di MALDI-TOF, il sequenziamento di nuova generazione (NGS) offre la possibilità di caratterizzare simultaneamente più geni di più pazienti. La sensibilità dei saggi NGS varia a seconda del tipo di pannello genico, della strategia di cattura dei target da analizzare, della piattaforma utilizzata e dell'algoritmo informatico di analisi del risultato. Alle metodiche NGS va comunque affiancata una metodica ortogonale sia per la conferma di casi dubbi che per l'analisi di campioni con DNA subottimale.

Solo nel caso che il tessuto a disposizione per il test EGFR sia limitato od insufficiente è possibile testare nel plasma il DNA libero circolante (cfDNA), procedura conosciuta come "biopsia liquida". Tuttavia bisogna ricordare, che non tutti i pazienti con adenocarcinoma del polmone e con mutazione del gene EGFR liberano nel torrente ematico alleli mutati e quindi un risultato negativo non esclude la presenza di una mutazione che dovrebbe essere ulteriormente ricercata con una successiva re-biopsia tessutale. La biopsia liquida è anche eseguita per identificare la mutazione inducente resistenza EGFR T790M in pazienti in progressione di malattia dopo trattamento di prima linea anti EGFR. Anche in questo caso, un riscontro negativo va verificato procedendo ad una re-biopsia tessutale.

Recenti studi hanno identificato una serie di meccanismi di resistenza all'inibitore di EGFR di III generazione, osimertinib, rappresentati da mutazioni di EGFR (in particolare C797S), PIK3CA, KRAS, BRAF, da meccanismi di amplificazione dei geni MET, HER2, PIK3CA e geni del ciclo cellulare (CCND, CCNE1, CDK4/6) e da meccanismi di fusione genica. La resistenza può talora essere sostenuta da meccanismi multipli. Al momento non ci sono indicazioni per la ricerca di queste alterazioni geniche nella pratica clinica, ma a breve potrebbero essere richieste in quanto in trials clinici si sta valutando l'efficacia di trattamenti combinati (ad esempio anti-EGFR e anti-MET).

## Messaggi chiave

- Il test mutazionale EGFR può essere eseguito sia su campioni istologici che su preparati citologici
- IL test mutazionale EGFR deve ricercare tutte le mutazioni attivanti che sono state descritte negli esoni 18-21, con una frequenza pari all'1%.
- Come per altre determinazioni molecolari è di fondamentale importanza la tempistica relativa all'esecuzione del test, il cui risultato deve pervenire entro 2 settimane (10 giorni lavorativi) dal momento della richiesta
- Nel momento della diagnosi iniziale, solo nel caso che il tessuto a disposizione per il test EGFR sia limitato od insufficiente è possibile testare nel plasma il DNA libero circolante (cfDNA), procedura conosciuta come "biopsia liquida".
- La biopsia liquida può risultare utile anche al momento della ripresa di malattia per valutare la presenza di meccanismi di resistenza acquisita.

## Bibliografia essenziale

Mok TS<sup>1</sup>, Wu YL, Thongprasert S, Yang CH, Chu DT, Saijo N, Sunpaweravong P, Han B, Margono B, Ichinose Y, Nishiwaki Y, Ohe Y, Yang JJ, Chewaskulyong B, Jiang H, Duffield EL, Watkins CL, Armour AA, Fukuoka M. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med.* 2009 Sep 3;361(10):947-57.

Mok TS<sup>1</sup>, Wu Y-L, Ahn M-J, Garassino MC, Kim HR, Ramalingam SS, Shepherd FA, He Y, Akamatsu H, Theelen WS, Lee CK, Sebastian M, Templeton A, Mann H, Marotti M, Ghiorghiu S, Papadimitrakopoulou VA. Osimertinib or Platinum-Pemetrexed in EGFR T790M-Positive Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2017 Feb 16;376(7):629-640

Lindeman NI, Cagle PT, Aisner DL, Arcila ME, Beasley MB, Bernicker EH, Colasacco C, Dacic S, Hirsch FR, Kerr K1, Kwiatkowski DJ, Ladanyi M, Nowak JA, Sholl L, Temple-Smolkin R, Solomon B, Souter LH, Thunnissen E, Tsao MS, Ventura CB, Wynes MW, Yatabe Y. Updated Molecular Testing Guideline for the Selection of Lung Cancer Patients for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: Guideline From the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology. *J Mol Diagn.* 2018 Mar;20(2):129-159.

Vigliar E, Malapelle U, Bellevicine C, de Luca C, Troncione G. Outsourcing cytological samples to a referral laboratory for EGFR testing in non-small cell lung cancer: does theory meet practice? *Cytopathology.* 2015 Oct;26(5):312-7.

Bellevicine C, Malapelle U, Vigliar E, Pisapia P, Vita G, Troncione G. How to prepare cytological samples for molecular testing. *J Clin Pathol.* 2017 Oct;70(10):819-826.

Hata A1, Katakami N, Yoshioka H, Kaji R, Masago K, Fujita S, Imai Y, Nishiyama A, Ishida T, Nishimura Y, Yatabe Y. Spatiotemporal T790M Heterogeneity in Individual Patients with EGFR-Mutant Non-Small-Cell Lung Cancer after Acquired Resistance to EGFR-TKI. *J Thorac Oncol.* 2015 Nov;10(11):1553-9.

Ellison G1, Zhu G, Moulis A, Dearden S, Speake G, McCormack R. EGFR mutation testing in lung cancer: a review of available methods and their use for analysis of tumour tissue and cytology samples. *J Clin Pathol.* 2013 Feb;66(2):79-89.

De Luca C, Gagnano G, Pisapia P, Vigliar E, Malapelle U, Bellevicine C, Troncione G. EGFR mutation detection on lung cancer cytological specimens by the novel fully automated PCR-based Idylla EGFR Mutation Assay. *J Clin Pathol.* 2017 Apr;70(4):295-300.

Vigliar E, Malapelle U, de Luca C, Bellevicine C, Troncione G. Challenges and opportunities of next-generation sequencing: a cytopathologist's perspective. *Cytopathology.* 2015 Oct;26(5):271-83.

Malapelle U, Mayo de-Las-Casas C, Rocco D, Garzon M, Pisapia P, Jordana-Ariza N, Russo M, Sgariglia R, De Luca C, Pepe F, Martinez-Bueno A, Morales-Espinosa D, González-Cao M, Karachaliou N, Viteri Ramirez S, Bellevicine C, Molina-Vila MA, Rosell R, Troncione G. Development of a gene panel for next-generation sequencing of clinically relevant mutations in cell-free DNA from cancer patients. *Br J Cancer.* 2017 Mar 14;116(6):802-810.

## Capitolo 4

### La valutazione dei biomarcatori per i tumori “oncogene addicted”: ALK

G. Fontanini, R. Franco, P. Graziano, A. Marchetti

Le alterazioni del gene ALK nei carcinomi polmonari rappresentano, nella maggioranza dei casi, la conseguenza di un riarrangiamento prodotto dalla inversione pericentrica nel braccio corto del cromosoma 2, con la produzione di un gene di fusione tra la porzione amino terminale del gene EML-4 (echinoderm microtubule-associated protein-like-4) e la regione iuxta-membrana del gene ALK (anaplastic lymphoma kinase). Il gene di fusione EML-4-ALK così generato, ha potenzialità trasformanti in vitro e in vivo ed è responsabile della sintesi di una proteina con capacità oncogeniche, di cui sono state identificate oltre 10 varianti. Il riarrangiamento EML-4-ALK (Fig. 1) incide dal 3 al 7% dei casi di carcinoma non a piccole cellule del polmone, con particolare riferimento agli adenocarcinomi. Oltre ad EML-4, sono stati identificati altri geni quali KIF-5B, TFG, KLC1. Le varianti di fusione del gene EML4-ALK, determinate dai differenti punti di rottura del partner EML-4, sono responsabili di corrispondenti varianti proteiche, diverse per peso molecolare e per capacità di risposta nei confronti degli inibitori tirosino-chinasici di ALK.

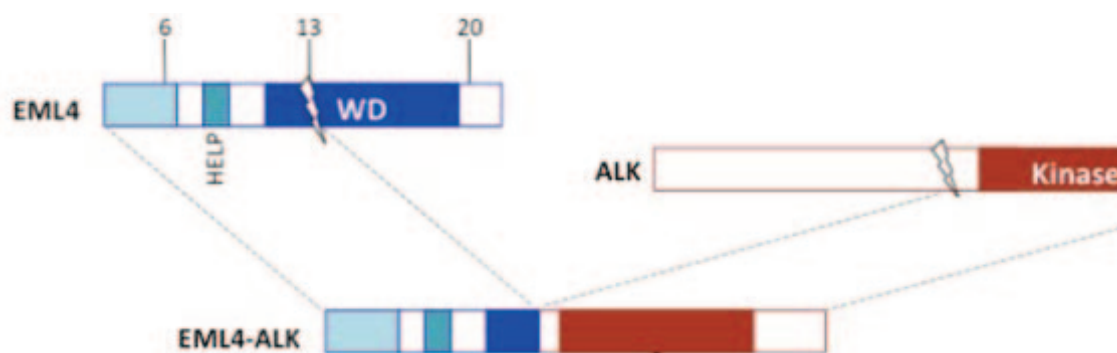


Fig. 1. Gene di Fusione EML-4-ALK

La prima evidenza clinica del ruolo predittivo della presenza del gene ALK riarrangiato nei confronti di inibitori tirosino-kinasici (TKI) di ALK nei carcinomi polmonari è stata dimostrata utilizzando una metodica di ibridazione in situ fluorescente (FISH), che consente di identificare le fusioni geniche prodotte da grandi inversioni o traslocazioni cromosomiche.

La metodica FISH può essere eseguita attraverso vari tipi di procedure: a) tests sviluppati direttamente all'interno di ogni singolo laboratorio, certamente meno costosi, ma che necessitano di procedure di validazione molto rigorose prima di essere introdotti nella pratica clinica o b) attraverso kits commerciali, approvati dagli organi regolatori (es: Abbot Vysis Break-Apart kit, FDA-approved) quest'ultimo utilizzato come "companion diagnostic" negli studi clinici che hanno portato alla approvazione di TKI specifici quali il crizotinib. I kit commerciali sono provvisti di protocolli dettagliati relativi alle procedure di esecuzione e di interpretazione dei dati anche se dovrebbero comunque essere validati accuratamente nei singoli laboratori utilizzando un numero adeguato di campioni di controllo, sia positivi che negativi.

Il nucleo di una cellula tumorale è considerato positivo al test FISH quando la distanza tra i segnali di fluorescenza rosso e verde è maggiore del diametro di due segnali. La presenza di un singolo segnale rosso senza la corrispondente presenza di un segnale verde, è dovuta ad una piccola delezione dell'estremità 5' di ALK e conseguentemente deve essere considerata come positiva, mentre la presenza di un singolo segnale verde in assenza del segnale rosso, è da considerarsi negativa. Nella pratica clinica viene considerato adeguato un campione in cui sia possibile identificare almeno 50 nuclei di cellule neoplastiche, con evidenza di una ibridazione di buona qualità. E' da considerarsi negativo un campione con una quantità di nuclei positivi al test FISH < al 10%; positivo un campione con una quantità di nuclei positivi al test FISH >50%; dubbio un campione con quantità compresa tra il 10 e il 50% dei nuclei ibridati. In quest'ultimo caso è necessario procedere alla verifica da parte di un secondo operatore che valuterà ulteriori 50 nuclei e la percentuale di nuclei riarrangiati si otterrà sommando entrambe le valutazioni. In questi casi, sarà considerato positivo un campione che presenterà una percentuale di nuclei ibridati > del 15%. L'identificazione del riarrangiamento EML4-ALK può essere eseguita anche con metodologie

alternative quali l'immunoistochimica (valutazione dell'espressione della proteina di fusione) e attraverso la valutazione qualitativa e quantitativa del trascritto (mRNA) del gene ALK riarrangiato tramite tecniche di reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR).

Il test immunoistochimico rappresenta oggi la metodologia più utilizzata nella valutazione di screening del riarrangiamento, in virtù della sua maggior versatilità rispetto alle tecniche FISH: robusto, semplice, rapido e meno costoso. Nonostante ciò alcune problematiche possono interferire con la buona resa del test immunoistochimico, richiedendo eventuali conferme con altre metodologie. Un'inadeguata fissazione può essere causa di una reazione immunoistochimica sub-ottimale con un campione che potrà risultare falso-negativo o eterogeneo nell'espressione della proteina.

In commercio sono disponibili vari anticorpi primari per l'allestimento di test in laboratorio, definiti LDT (Laboratory Developed Test) e test completi sviluppati e validati per la diagnostica in vitro, noti come IVD (In Vitro Diagnostics), comprensivi di sistemi per l'amplificazione del segnale; in considerazione della relativamente bassa concentrazione della proteina riarrangiata nelle cellule neoplastiche, nello sviluppo di test LDT è consigliato l'utilizzo di sistemi di rivelazione in grado di amplificarne il segnale.

Nei Carcinomi Polmonari Non a Piccole Cellule, l'immuno-colorazione è citoplasmatica, talora con pattern granulare, generalmente con rinforzo di membrana. In relazione al tipo di test utilizzato, è possibile un sistema di valutazione di tipo binario (positivo/negativo), valido per i test IVD, o una valutazione dell'immunoreazione graduabile come intensa (3+), moderata (2+), debole (1+) qualora si ricorra ad un test LDT. In quest'ultimo caso, in presenza di immunocolorazioni moderate o deboli, è richiesta una conferma mediante FISH.

La presenza del riarrangiamento può essere rilevata anche mediante saggi di RT-PCR, principalmente di due tipi: a) saggi che consentono di rilevare solo varianti di fusione note, utilizzando primers e sonde specifici; b) saggi che permettono di rilevare livelli di espressione sbilanciati tra le regioni al 3' e le regioni al 5' del gene ALK.

Il primo approccio è tra i più sensibili e robusti per identificare esattamente le varianti di fusione, ma ha un'utilità limitata come metodologia di screening perché, anche quando basata su saggi multiplex, è possibile analizzare solo le varianti più comuni, pertanto la percentuale di falsi negativi è maggiore rispetto alle altre metodologie. Il secondo approccio si presta meglio come metodica di screening, basandosi infatti sulla non espressione del gene ALK nel tessuto polmonare normale e sulla conseguente espressione differenziale tra regioni al 3' e regioni al 5' del gene ALK in presenza di riarrangiamento, a prescindere dal pattern di fusione. Sebbene la RT-PCR consenta una rilevazione più oggettiva e meno influenzata dalla variabilità inter-osservatore rispetto a FISH ed immunohistochimica, non è la metodica d'elezione nella pratica clinica del NSCLC, soprattutto per il "failure rate" non trascurabile che la caratterizza: richiede infatti un RNA di buona qualità, spesso difficile da ottenere dai campioni biologici utilizzati di routine.

Oltre alle metodiche "single marker" precedentemente descritte, la valutazione delle fusioni del gene ALK è possibile anche usando metodiche multimarkers. Si tratta principalmente di saggi transcript-based (valutazione dell'mRNA del gene riarrangiato), che sfruttano la tecnologia di next generation sequencing (NGS). Sono diversi i pannelli disponibili, alcuni dei quali già validati, basati sia sulla chimica amplicon based che sulla chimica hybrid capture, che consentono di rilevare la presenza di riarrangiamento genico ed anche di caratterizzarne le varianti di fusione. Il numero di varianti di fusione caratterizzabili dipende strettamente dal tipo di pannello utilizzato.

Infine, recentemente, tra le metodiche di analisi multimarkers per la valutazione dei riarrangiamenti genici è stato proposto anche il sistema nCounter (Nanostring technology), basato sull'ibridazione di sonde molecolari (barcode fluorescenti) direttamente con molecole di mRNA target. Contrariamente alle altre tecniche transcript based, il sistema nCounter consente una conta diretta delle molecole di mRNA target presenti nel campione, senza nessuno step di retrotrascrizione o amplificazione, rendendo questa metodica meno sensibile a problemi ed artefatti legati ai processi di preparazione del campione. I pannelli per la valutazione dei geni di fusione basati sulla tecnologia nCounter contengono sia sonde che consentono di rilevare lo sbilanciamento tra regione 3' e 5' del gene indagato (rilevazione della presenza di riarrangiamento a prescindere dal

partner) sia sonde specifiche per le varianti di fusioni note (caratterizzazione varianti).

L'inserimento delle metodologie multimarkers nella pratica clinica è sicuramente vantaggioso per quel che riguarda l'ottimizzazione del materiale, tuttavia, sebbene siano già disponibili kit validati, FISH ed immunistochemica rimangono ad oggi le metodiche d'elezione. In particolare, l'approccio con il miglior rapporto costi-benefici, prevede l'immunistochemica come metodica di screening e la FISH per la valutazione dei casi ambigui. Recenti studi hanno evidenziato che in circa il 10% dei casi valutati con entrambe le metodologie (FISH e IHC) si hanno dati discordanti. Quando questo si verifica in genere il paziente risponde ai farmaci anti-ALK. Circa il 50% dei casi FISH+/IHC- e quasi la totalità dei casi IHC+/FISH- risponde al trattamento. Tuttavia, utilizzare entrambi gli approcci diagnostici non è praticabile nella routine clinica. Per ovviare a questo problema e non perdere pazienti per il trattamento specifico anti-ALK, sono stati sviluppati vari algoritmi diagnostici come quello riportato in fig. 2. L'algoritmo prevede l'immunistochemica come metodologia di screening, effettuabile con metodica validata commercialmente per la diagnostica (IVD) o allestita in laboratorio (LDT) con i rispettivi score sopra riportati. Nel caso di negatività al test, è previsto il recupero dei pazienti qualora questi abbiano caratteristiche clinico-patologiche che li espongono maggiormente alla presenza delle fusioni di ALK. Per tali pazienti si suggerisce comunque una analisi FISH di conferma.

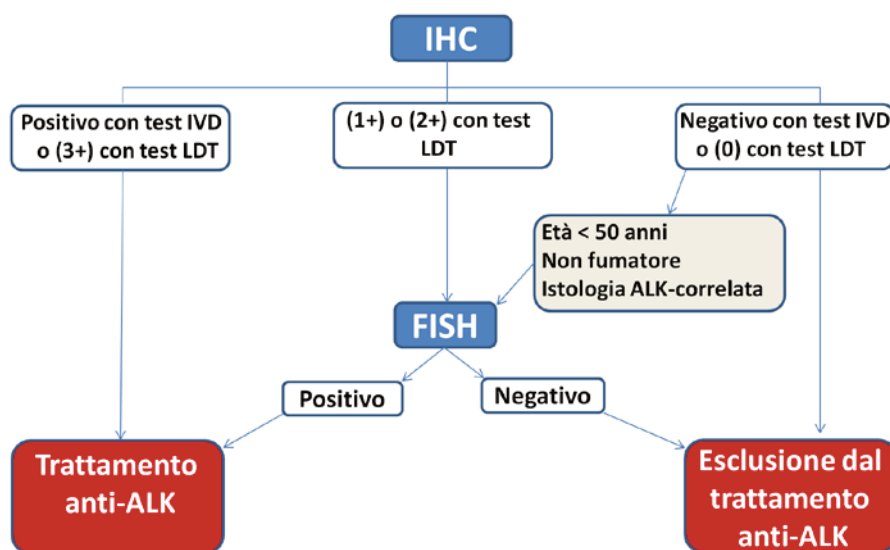


Fig. 2. Algoritmo per la selezione dei pazienti candidabili al trattamento anti-ALK

Modificato da Marchetti et al, JTO 2016

Oltre alla caratterizzazione dei riarrangiamenti genici predittivi di risposta agli ALK TKI, molto probabilmente in un prossimo futuro, sarà importante anche la valutazione delle alterazioni molecolari responsabili dello sviluppo di meccanismi di resistenza, che solitamente occorrono circa 12 mesi dopo l'inizio del trattamento. I meccanismi di resistenza si dividono essenzialmente in ALK dipendenti (mutazioni secondarie o amplificazioni del gene ALK) o indipendenti (attivazione di pathways di segnale alternativi: EGFR, c-KIT, KRAS, etc). Più raramente si osservano cambiamenti del tipo istologico tumorale.

Le mutazioni di resistenza riguardano principalmente gli esoni 22, 23 e 25 del gene ALK e la loro frequenza dipende dallo specifico TKI impiegato. Le mutazioni L1196M e G1269A sono le più frequenti dopo trattamento con TKI di prima generazione (crizotinib), mentre la G1202R è predominante dopo trattamento con TKI di seconda.

E' stato dimostrato che gli ALK TKI hanno un'efficacia diversa a seconda dell'alterazione molecolare presente, pertanto la loro corretta determinazione sarà cruciale per stabilire il piano terapeutico più appropriato. Ad esempio il Lorlatinib, inibitore di terza generazione è l'unico che riesce a bypassare la mutazione di resistenza G1202R, mentre ha tra i suoi meccanismi di resistenza la mutazione secondaria L1198F, che conferisce però sensibilità al Crizotinib. Considerata la molteplicità dei meccanismi di resistenza descritti e l'importanza di una loro caratterizzazione completa, l'utilizzo di tecniche di NGS per la caratterizzazione molecolare delle re-biopsie e/o delle biopsie liquide è considerato l'approccio analitico migliore. Al momento non c'è nessuna indicazione per la ricerca di queste alterazioni geniche nella pratica clinica ma il loro utilizzo può risultare importante per l'inserimento dei pazienti in trials clinici dedicati.

## Messaggi chiave

- 1 La valutazione IIC del riarrangiamento ALK è una procedura validata e standardizzata e rappresenta una metodologia di screening per l'identificazione del riarrangiamento
- 2 La FISH è una tecnica affidabile per la evidenziazione del riarrangiamento ALK sia nei campioni istologici che citologici (strisci diretti) e resta la metodologia da utilizzare per confermare casi dubbi, soprattutto nei casi con caratteristiche cliniche compatibili con la presenza del riarrangiamento
- 3 Le tecnologie NGS rappresentano un approccio diagnostico innovativo in grado di fornire informazioni affidabili non solo sulla presenza del riarrangiamento e delle diverse varianti di fusione ma anche per l'analisi e l'identificazione di meccanismi di resistenza target-correlati.

### Bibliografia essenziale

- Thunnissen , E., Bubendorf, L., Dietel, M., ElMBERGER, G., Kerr, K., Lopez-Rio, F., et al. EML-4-ALK testing in NSCLC of the lung: a review with recommendations. *Virchows Arch* 2012, 461: 245-57.
- Gruber K, Horn H, Kalla J, Fritz P, Rosenwald A, Kohlhäufel M, Friedel G, Schwab M, Ott G, Kalla C. Detection of rearrangements and transcriptional up-regulation of ALK in FFPE lung cancer specimens using a novel, sensitive, quantitative reverse transcription polymerase chain reaction assay. *J Thorac Oncol.* 2014;9: 307-15.
- Rogers T-M, Arnau GM, Ryland GL, et al. Multiplexed transcriptome analysis to detect ALK, ROS1, and RET rearrangements in lung cancer. *Sci Rep.* 2017; 7: 42259.
- Cortinovis D, Canova S, Abbate MI, Colonese F, Cogliati V, Bidoli P. Challenges in ALK inhibition of ALK-positive non-small-cell lung cancer: from ALK positivity detection to treatment strategies after relapse. *Future Oncol.* 2018; 14: 2303-2317.
- Shaw AT, Friboulet L, Leshchiner I, Gainor JF, Bergqvist S, Brooun A, Burke BJ, Deng YL, Liu W, Dardaei L, Frias RL, Schultz KR, Logan J, James LP, Smeal T, Timofeevski S, Katayama R, Iafrate AJ, Le L, McTigue M, Getz G, Johnson TW, Engelman JA. Resensitization to Crizotinib by the Lorlatinib ALK Resistance Mutation L1198F. *N Engl J Med.* 2016 7; 374: 54-61.
- Marchetti A, Di Lorito A, Pace MV, Iezzi M, Felicioni L, D'Antuono T, Filice G, Guetti L, Mucilli F, Buttitta F. ALK Protein Analysis by IHC Staining after Recent Regulatory Changes: A Comparison of Two Widely Used Approaches, Revision of the Literature, and a New Testing Algorithm.. *J Thorac Oncol.* 2016;11:487-95.

## Capitolo 5

# La valutazione dei biomarcatori per i tumori “oncogene addicted”: ROS1

G. Rossi, M. Papotti, A. Marchetti

---

Il carcinoma non-a piccole cellule del polmone (NSCLC) rappresenta un gruppo di neoplasie contraddistinte da diversi tipi istologici, ma soprattutto da specifiche alterazioni molecolari, tra le quali il riarrangiamento del gene ROS1 (V-Ros Avian UR2 Sarcoma Virus Oncogene Homolog-1). Il gene ROS1 possiede un'elevata omologia con il gene ALK ed i pazienti con tumore ROS1 o ALK positivi possono beneficiare della stessa categoria di farmaci inibitori.

Il gene ROS1 codifica per una tirosina chinasi costitutivamente attivata in presenza di riarrangiamento. La prevalenza di questo riarrangiamento è intorno all'1-2% di tutti i NSCLC e si associa più frequentemente ad istotipo adenocarcinoma in pazienti giovani (<50 anni), lievi/non fumatori ed al sesso femminile. I NSCLC ROS1 positivi tendono ad essere molto aggressivi e la diagnosi viene solitamente posta quando la neoplasia è già metastatica.

La maggior parte dei riarrangiamenti di ROS1 avviene a livello inter-cromosomico e più raramente intracromosomico. Il dominio chinasi di ROS1 (regione 3') è conservato e si fonde con uno dei molteplici geni di fusione (CD74, EZR, FIG1, CCD6, KDELR2, LRI3, SDC4, SLC34A2, TPM3, TPD52L1, WNK1, GOPC). Il riarrangiamento di ROS1 è stato riscontrato solo sporadicamente in NSCLC con alterazioni di EGFR, KRAS o ALK.

Con determina pubblicata il 23 maggio 2018 in Gazzetta Ufficiale, l'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA) ha autorizzato la rimborsabilità di crizotinib per il trattamento di pazienti adulti con NSCLC in stadio avanzato positivo per ROS1. Il tempo medio di efficacia del farmaco è di circa 17 mesi con una percentuale di risposta superiore al 70% nella popolazione con tumore ROS1 positivo.

L'identificazione del riarrangiamento del gene ROS1 è oggi obbligatorio in tutti i pazienti affetti da NSCLC in stadio avanzato (IIIB e IV) ad istotipo non-squamoso ed in tutti i pazienti non fumatori con NSCLC. Non esiste il test perfetto per questa determinazione, ma sono disponibili diverse

tecniche per l'analisi del riarrangiamento del gene ROS1 e il "gold standard" è ancora rappresentato dalla ibridazione in-situ con fluorescenza (FISH) per la quale sono disponibili in commercio valide sonde "break-apart", ma che richiede laboratori attrezzati e personale esperto nell'identificazione del riarrangiamento attraverso l'osservazione di positività per inversione (split dei segnali) o delezione (presenza del solo segnale in regione 3'). Accanto alla FISH, un'altra metodica ampiamente utilizzata, poco costosa e di rapida esecuzione è l'immunoistochimica, che, impiegando piattaforme automatizzate, analizza l'espressione della proteina ROS1 (normalmente non presente nel tessuto normale) con il clone anticorpale D4D6. Altri cloni saranno a breve disponibili in commercio (tra cui il clone SP384). La problematica maggiore per questa metodica è la mancanza di uno scoring system universalmente validato (alcuni studi hanno utilizzato la presenza di espressione solo per intensità almeno moderata (2+), altri un punteggio >100 ottenuto dalla combinazione H-score della percentuale di cellule neoplastiche positive e dell'intensità di espressione) e la necessità di disporre sempre di tessuto tumorale (preferibilmente sullo stesso vetrino) come controllo esterno per validare la reazione di ogni test eseguito. Da tenere sempre presente che possono presentarsi alcune difficoltà interpretative nella gestione della diagnosi immunoistochimica di ROS1, in particolare un'aberrante immunoreattività nella componente pneumocitaria iperplastica benigna che può generare falsi positivi soprattutto su piccole biopsie, mentre la presenza di muco intracitoplasmatico nelle cellule tumorali può determinare casi falsamente negativi. Immunoistochimica e FISH rappresentano le tecniche di elezione come test di screening e l'utilizzo combinato di entrambe è attualmente la tipologia di algoritmo maggiormente impiegato nella pratica clinica quotidiana. Metodiche di sequenziamento di nuova generazione (NGS) con kit specifici per l'identificazione del riarrangiamento di ROS1 e reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) (es. NanoString) sono state approvate dalla Food and Drug Administration (FDA) negli Stati Uniti.

In effetti, sia l'Agenzia Europea (EMA) che quella Italiana (AIFA) non si sono espresse in merito all'obbligatorietà di utilizzo delle differenti metodiche, lasciando arbitrariamente aperta la possibilità di identificare il paziente con NSCLC ROS1 positivo con tecnica validata.

Differenti algoritmi sono stati proposti nello screening per la ricerca di riarrangiamento di ROS1 nel NSCLC. Un gruppo europeo di patologi esperti di biologia molecolare nei tumori polmonari ha proposto delle raccomandazioni per un corretto approccio basato sull'utilizzo integrato dell'immunoistochimica e della FISH e biologia molecolare nella diagnostica di routine del NSCLC. Le raccomandazioni sottolineano anche la necessità di attenersi a solide regole nella fase pre-analitica e di validazione interna a ciascun laboratorio sul programma di screening, considerando le diversità delle piattaforme impiegate per l'immunoistochimica e delle sonde "break-apart" FISH disponibili in commercio. Sulla base dei risultati della letteratura, l'algoritmo che prevede lo screening dei pazienti per il riarrangiamento di ROS1 con immunoistochimica e la conferma dell'eventuale positività con metodica FISH è quello più largamente utilizzato, consentendo di ridurre sensibilmente i costi ed inutili attese per i pazienti ROS1-negativi. Se possibile, si raccomanda di poter disporre di un prelievo istologico o di cito-incluso (da ottenere tutte le volte che si esegue una procedura agoaspirativa o nei versamenti). Materiale citologico convenzionale strisciato può essere utile per l'indagine FISH, purché in assenza di aree necrotiche o emorragiche. I principali meccanismi di resistenza agli inibitori specifici di ROS1 sono rappresentati da mutazioni di ROS1 (in particolare G2032R), c-KIT, KRAS, beta-catenina, PIK3CA e variazioni del numero di copie geniche di vari proto-oncogeni (PDGFRA, KIT, KDR, GNAS, K/HRAS, RET, NTRK1, MAP2K1). Al momento non c'è nessuna indicazione per la ricerca di queste alterazioni geniche nella pratica clinica.

## Messaggi chiave

- Il riarrangiamento del gene ROS1 deve essere ricercato in tutti i casi di NSCLC in stadio avanzato con istotipo non-squamoso e squamoso in soggetti non fumatori.
- Lo screening mediante l'utilizzo integrato di immunocistochimica e FISH rappresenta la modalità più diffusa e disponibile attualmente adottata dalla maggior parte dei laboratori di Anatomia Patologica, ma il risultato derivato da metodiche di NGS e RT-PCR è ugualmente accettato per accedere a terapia con inibitore selettivo di ROS1.
- In letteratura sono stati riportati diversi meccanismi di resistenza ad inibitori di ROS1 (in particolare alcune mutazioni del gene ROS1), che tuttavia non sono al momento necessariamente da indagare.

## Bibliografia essenziale

Bubendorf L, Büttner R, Al-Dayel F, Dietel M, Elmberger G, Kerr K, López-Ríos F, Marchetti A, Öz B, Pauwels P, Penault-Llorca F, Rossi G, Ryška A, Thunnissen E. Testing for ROS1 in non-small cell lung cancer: a review with recommendations. *Virchows Arch.* 2016 Nov;469(5):489-503

McCoach CE, Le AT, Gowan K, Jones K, Schubert L, Doak A, Estrada-Bernal A, Davies KD, Merrick DT, Bunn PA Jr, Purcell WT, Dziadziuszko R, Varella-Garcia M, Aisner DL, Camidge DR, Doebele RC. Resistance Mechanisms to Targeted Therapies in ROS1+ and ALK+ Non-small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res.* 2018 Jul 15;24(14):3334-3347

Rossi G, Jocolle G, Conti A, Tiseo M, Zito Marino F, Donati G, Franco R, Bono F, Barbisan F, Facchinetti F. Detection of ROS1 rearrangement in non-small cell lung cancer: current and future perspectives. *Lung Cancer (Auckl).* 2017 Jul 7;8:45-55

Facchinetti F, Rossi G, Bria E, Soria JC, Besse B, Minari R, Friboulet L, Tiseo M. Oncogene addiction in non-small cell lung cancer: Focus on ROS1 inhibition. *Cancer Treat Rev.* 2017 Apr;55:83-95.

Davies KD, Le AT, Sheren J, Nijmeh H, Gowan K, Jones KL, Varella-Garcia M, Aisner DL, Doebele RC. Comparison of Molecular Testing Modalities for Detection of ROS1 Rearrangements in a Cohort of Positive Patient Samples. *J Thorac Oncol.* 2018 Oct;13(10):1474-1482

Hofman V, Rouquette I, Long-Mira E, Piton N, Chamorey E, Heeke S, Vignaud JM, Yguel C, Mazières J, Lepage AL, Bibeau F, Begueret H, Lassalle S, Lalvée S, Zahaf K, Benzaquen J, Poudenx M, Marquette CH, Sabourin JC, Ilié M, Hofman P. Multicenter evaluation of a novel ROS1 immunohistochemistry assay (SP384) for detection of ROS1 rearrangements in a large cohort of lung adenocarcinoma patients. *J Thorac Oncol.* 2019 Apr 15. pii: S1556-0864(19)30283-7

Rogers TM, Arnau GM, Ryland GL, Huang S, Lira ME, Emmanuel Y, Perez OD, Irwin D, Fellowes AP, Wong SQ, Fox SB. Multiplexed transcriptome analysis to detect ALK, ROS1 and RET rearrangements in lung cancer. *Sci Rep.* 2017 Feb 9;7:42259.

## Capitolo 6

### **La valutazione dei biomarcatori per i tumori “oncogene addicted”: BRAF**

**F. Buttitta, C. Doglioni, R. Franco**

---

Nei carcinomi polmonari non a piccole cellule con istotipo non-squamoso, oltre alle mutazioni di EGFR, ALK, ROS1, la cui determinazione è pratica clinica, recentemente anche le alterazioni di un altro gene, BRAF, sono state prese in considerazione in funzione del trattamento.

BRAF fa parte di una famiglia di proteine chinasiche, includenti ARAF e CRAF, tutte regolate da RAS, nella via di trasmissione del segnale RAS/MAPK/ERK, attraverso una omo-eterodimerizzazione che è cruciale nel processo catalitico di fosforilazione di molecole di serina e treonina sulle proteine bersaglio MEK1/2 a valle.

Il gene BRAF è mutato in circa l'8% dei tumori solidi, con un'incidenza maggiore nel melanoma (50%) e nel carcinoma papillare della tiroide (30-70%), una incidenza più bassa ma ugualmente importante nel cancro coloretale (5-20%) e nel carcinoma sieroso ovarico di basso grado, mentre nei tumori polmonari non a piccole cellule l'incidenza delle mutazioni di BRAF si aggira intorno al 3-5%.

Circa 200 mutazioni del gene BRAF, includenti anche traslocazioni, sono state identificate nei tumori umani e molte di queste sono alla base di alterazioni strutturali della proteina responsabili dell'attivazione permanente del pathway MAPK e della resistenza a segnali “feedback” inibitori. La più frequente mutazione di BRAF è una alterazione puntiforme della sequenza genica, nell'esone 15 (c.1799 T > A), che determina la sostituzione di una valina con glutammato al codone 600 (V600E). Questa mutazione conferisce alla proteina BRAF due importanti proprietà oncogeniche: 1) aumenta l'attività del dominio chinamico di ~500 volte rispetto a quella della proteina normale; 2) conferisce alla proteina BRAF la possibilità di essere attiva in forma monomerica e quindi anche quando l'attività RAS è bassa e comunque indipendentemente dall'attivazione mediata da RAS. Il risultato è una iperattivazione di BRAF che attiva in maniera costitutiva ERK, indipendentemente dall'attivazione di RAS, e ignorando il feedback negativo dipendente da ERK.

A differenza di quanto si verifica per forme tumorali non polmonari in cui la mutazione V600E

rappresenta la quasi totalità delle mutazioni di BRAF (80-98% dei casi mutati), nel NSCLC la mutazione V600E è presente in poco più della metà dei casi mutati, mentre la restante percentuale comprende varie altre mutazioni sia nell'esone 15 (L597V, D594G, G606A, G606V, L597R, L597V, L597Q, V K601E, , K601N, W604R) sia nell'esone 11 (G469A, G469V, G466V).

Nel cancro polmonare le mutazioni di BRAF sono fondamentalmente concentrate nel tipo istologico adenocarcinoma all'interno del quale emerge una associazione tra la variante genica V600E e le forme di adenocarcinoma non mucinoso con pattern di crescita micropapillare e marcatamente over-esprimenti TTF-1. Questa associazione conferisce alla mutazione V600E un significato prognostico sfavorevole in quanto il fenotipo micropapillare si contraddistingue per un comportamento biologico aggressivo, che sul piano clinico si traduce in una ridotta DFS e OS rispetto ai pazienti wild type. Le mutazioni non-V600E sono soprattutto riscontrabili in forme differenti di adenocarcinoma, incluso il tipo mucinoso. Inoltre, alcuni studi riportano che la V600E sembra essere più frequente nel sesso femminile e indipendente dall'abitudine tabagica.

Dati numericamente limitati sottolineano una tendenza alla associazione fra forme di tumore polmonare BRAF mutate non-V600E, l'abitudine tabagica e la presenza di un maggiore carico mutazionale.

L'analisi molecolare del gene BRAF, nel cancro polmonare, non è alla data attuale indicata al di fuori dei trials clinici. Tuttavia, sulla base di numerose evidenze, le linee guida CAP (College of American Pathologists), IASLC (International Association for the Study of Lung Cancer) e AMP (Association for Molecular Pathology) suggeriscono di effettuare l'analisi mutazionale di BRAF o all'interno di pannelli multigenici utilizzati per la valutazione dei geni entrati nella pratica clinica oppure quando l'esito degli esami mutazionali di EGFR, ALK e ROS1 è risultato globalmente negativo. Il successivo "endorsement" di ASCO alle Linee Guida presentate da CAP/IASLC e AMP cita l'analisi del gene BRAF fra le analisi che devono essere effettuate in tutti i pazienti con adenocarcinoma del polmone in fase avanzata, indipendentemente dalle caratteristiche cliniche. Da numerosi studi, infatti, è emerso che i pazienti con mutazione V600E rispondono poco alla chemioterapia, mentre sono sensibili agli inibitori di BRAF. Vemurafenib, già testato nel melanoma BRAF mutato, ha dimostrato una buona efficacia nei pazienti con cancro del polmone BRAF mutato, ma con un modesto

response rate.

Un altro inibitore di BRAF, Dabrafenib, è stato inizialmente valutato in monoterapia e ha comportato un tasso di risposta del 30% circa per i pazienti con la mutazione V600E. Quando dabrafenib è stato utilizzato in combinazione con trametinib (inibitore di MEK), la combinazione ha dimostrato di rallentare la crescita del tumore in modo più efficace rispetto a quanto si osserva con entrambi i trattamenti in monoterapia. Recentemente, la combinazione di dabrafenib e trametinib è stata approvata dalla FDA a seguito degli studi che hanno evidenziato un tasso di risposta del 65% e una mediana PFS di quasi 10 mesi. Questo regime è ora il trattamento standard per i pazienti con la mutazione BRAF V600E. Anche in Europa, l'Agencia Europea del Farmaco (EMA) ha espresso parere positivo, raccomandando l'approvazione di dabrafenib in combinazione con trametinib per il trattamento dei pazienti con carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC) in fase avanzata o metastatico e presenza della mutazione BRAF V600. Purtroppo, nonostante la dimostrata efficacia di tali regimi terapeutici, nel tempo è possibile osservare lo sviluppo di una resistenza agli inibitori di BRAF con meccanismi diversi, basati sulla attivazione di altre molecole coinvolte nello stesso pathway di BRAF. Alla data attuale, la maggior parte delle conoscenze sulla resistenza agli inibitori di BRAF derivano dagli studi condotti su pazienti affetti da melanoma, mentre molto limitati sono i dati concernenti il cancro del polmone. Recentemente, la mutazione V600E è stata descritta come possibile meccanismo di resistenza agli inibitori anti-EGFR di terza generazione.

## Messaggi Chiave

- La valutazione dello stato mutazionale di BRAF deve essere inclusa nell'algoritmo diagnostico per il paziente con adenocarcinoma polmonare indipendentemente dalle caratteristiche cliniche.
- I tumori polmonari BRAF mutati hanno un comportamento generalmente più aggressivo rispetto ai tumori non mutati e sono meno responsivi alla chemioterapia.
- Sono disponibili oggi farmaci in grado di bloccare la proliferazione di un tumore polmonare con mutazione V600E di BRAF.
- Le mutazioni di BRAF possono contribuire allo sviluppo della resistenza agli anti-EGFR e agli inibitori di BRAF.

## Bibliografia essenziale

- Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, et al. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* 2004; 116: 855-67
- Yao Z, Torres NM, Tao A, et al. BRAF Mutants Evade ERK-Dependent Feedback by Different Mechanisms that Determine Their Sensitivity to Pharmacologic Inhibition. *Cancer Cell*. 2015 Sep 14;28(3):370-83
- Paik PK, Arcila ME, Fara M, et al. Clinical characteristics of patients with lung adenocarcinomas harboring BRAF mutations. *J Clin Oncol* 2011; 29: 2046-51.
- Marchetti A, Felicioni L, Malatesta S, et al. Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer harboring BRAF mutations. *J Clin Oncol* 2011; 29: 3574-9.
- Lindeman NI, Cagle PT, Aisner DL et al. Updated Molecular Testing Guideline for the Selection of Lung Cancer Patients for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: Guideline From the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology. *J Mol Diagn*. 2018 Mar;20(2):129-159
- Kalemkerian GP, Narula N, Kennedy EB, Biermann WA, Donington J, Leighl NB, Lew M, Pantelas J, Ramalingam SS, Reck M, Saqi A, Simoff M, Singh N, Sundaram B. Molecular Testing Guideline for the Selection of Patients With Lung Cancer for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: American Society of Clinical Oncology Endorsement of the College of American Pathologists/International Association for the Study of Lung Cancer/Association for Molecular Pathology Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol*. 2018 Mar 20;36(9):911-919
- Peters S, Michielin O, Zimmermann S. Dramatic response induced by vemurafenib in a BRAF V600E-mutated lung adenocarcinoma. *J Clin Oncol*. 2013 Jul 10;31(20):e341-4
- Planchard D, Besse B, Groen HJM, et al. Dabrafenib plus trametinib in patients with previously treated BRAF V600E-mutant metastatic non-small cell lung cancer: an open label phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2016;17(7):984-993
- Chan XY1, Singh A, Osman N et al. Role Played by Signalling Pathways in Overcoming BRAF Inhibitor Resistance in Melanoma. *Int J Mol Sci*. 2017 Jul 14;18(7). pii: E1527
- Bearz A, De Carlo E, Doliana R, et al. Acquired BRAF V600E Mutation as Resistant Mechanism after Treatment with Third-Generation EGFR Tyrosine Kinase Inhibitor. *J Thorac Oncol*. 2017 Nov;12(11):e181-e182.

## Capitolo 7

### **Il test PD-L1 per la selezione all'immunoterapia.**

#### **Armonizzazione, cloni e cut-off.**

**C. Doglioni, G. Troncone, G. Fontanini, A. Marchetti, M. Barberis, M. Papotti**

---

L'espressione della proteina PD-L1 (Programmed death ligand 1) è riconosciuta come valido marcatore per la selezione dei pazienti con NSCLC da sottoporre a particolari trattamenti immunoterapici bloccanti l'asse PD1-PD-L1. La valutazione dell'espressione immunoistochimica di PD-L1 nelle cellule tumorali è il test necessario per l'utilizzo di questi farmaci. La Food and Drug Administration (FDA) statunitense ha introdotto il termine "Companion Diagnostics" per definire un test diagnostico necessario per l'utilizzo di un determinato farmaco, quando l'efficacia clinica del farmaco sia stata dimostrata essere in relazione con il risultato del test in studi clinici. Le attuali indicazioni degli Enti Regolatori (EMA, AIFA), indicano come Companion Diagnostic in termini generici la determinazione dell'espressione di PD-L1 con metodica immunoistochimica validata per l'utilizzo del farmaco pembrolizumab in monoterapia nei pazienti con NSCLC in stadio avanzato (IIIb-IV), in prima linea quando il tumore è EGFR wild type ed ALK non riarrangiato, ed in seconda linea quando precedenti terapie non risultano più efficaci. Il farmaco può essere utilizzato in prima linea quando il livello di espressione di PD-L1 nelle cellule tumorali è  $\geq 50\%$  e in seconda linea quando l'espressione di PD-L1 è  $\geq 1\%$ . Più recentemente, il farmaco durvalumab è stato introdotto nella pratica clinica per il trattamento del NSCLC in stadio III localmente avanzato, non resecabile, nei pazienti il cui tumore presenta un'espressione immunoistochimica di PD-L1  $\geq 1\%$  sulle cellule tumorali e la cui malattia non è progredita a seguito di chemioradioterapia a base di platino.

E' quindi di estrema importanza una precisa valutazione dell'espressione di PD-L1 con metodologia validata ed affidabile per fornire un dato preciso e riproducibile. Gli studi clinici che hanno portato all'approvazione del farmaco pembrolizumab hanno utilizzato il test PD-L1 IHC 22C3 pharmDx (Agilent-Dako) come test diagnostico su piattaforma DAKO. Gli studi che hanno portato all'approvazione di durvalumab hanno invece utilizzato il test SP263 (Ventana) su piattaforma

Ventana Benchmark. Sono stati sperimentati altri farmaci anti PD-1 ed anti PD-L1, ognuno dei quali ha utilizzato come test per la valutazione di PD-L1 un proprio anticorpo con specifici sistemi di rivelazione e piattaforme diverse (Tab 1). A tutto ciò va aggiunta la disponibilità sempre crescente di ulteriori anticorpi diagnostici anti-PD-L1. Al momento attuale nella terapia dei NSCLC solo i farmaci pembrolizumab e durvalumab necessitano del test per PD-L1 per la selezione dei pazienti al trattamento. Per gli altri farmaci, la valutazione dell'espressione di PD-L1 è un Complementary Test, un test opzionale che può dare informazioni cliniche utili, ma che non condiziona la scelta terapeutica. La presenza di più farmaci con i corrispettivi test diagnostici ha creato molte difficoltà nell'applicazione pratica della valutazione di PD-L1, sia per il problema della comparabilità dei risultati con i diversi test, sia perché molti laboratori non disponevano della specifica piattaforma su cui eseguire il test. A questa situazione di incertezza ha risposto la comunità scientifica con una serie di studi che, comparando i diversi test PD-L1 sviluppati commercialmente per la diagnostica in vitro (IVD) basati sui cloni 22C3, 28-8 e SP263, hanno dimostrato come questi abbiano prestazioni molto simili, indicando così la possibilità del loro utilizzo intercambiabile (ref 1-2). E' raccomandato, per assicurare risultati affidabili, costanti e riproducibili, l'utilizzo nella pratica diagnostica di questi reagenti IVD ed in particolare dei test che contengono gli anticorpi 22C3 e SP263 standardizzati su piattaforme diverse. Tuttavia, anche utilizzando questi kit diagnostici, è necessario monitorare costantemente la sensibilità e la specificità della reazione tramite l'inserimento di controlli positivi durante ogni corsa di reazione, preferibilmente posizionando la sezione controllo sullo stesso vetrino del caso da testare. Il tessuto di controllo da utilizzare è la tonsilla in quanto in essa sono rappresentati componenti cellulari con uno spettro di reattività che va dall'intenso (epitelio criptico) al debole (macrofagi dei centri germinativi), permettendo quindi di valutare l'adeguata sensibilità della reazione. Non è opportuno utilizzare come controllo la placenta perché essa esprime livelli molto elevati di PD-L1 e potrebbe non rendere evidente una reazione falsamente negativa nel caso in esame.

Alcuni laboratori, per motivi economici o di non disponibilità delle piattaforme Dako/Agilent o Ventana/Roche, hanno sviluppato propri test di valutazione dell'espressione di PD-L1 che sono definiti come Laboratory Developed Test (LDT). L'utilizzo di anticorpi anti PD-L1 ben caratterizzati,

con sistemi di rivelazione adeguati può essere una alternativa accettabile ai kit diagnostici nella determinazione dell'espressione di PD-L1 nei tumori. Questi test possono dare risultati adeguati come testimoniato da lavori scientifici e dai controlli di qualità organizzati dal NordiQC e dal NEQAS. Va però sottolineato come un laboratorio che intenda sviluppare ed utilizzare un proprio LDT nella pratica clinica debba effettuare un rigoroso percorso di sviluppo e di validazione ( ref.3 ), utilizzando un appropriato numero di casi positivi e negativi previamente testati con un kit diagnostico di riferimento ( ad esempio 22C3 o SP263) e valutando un ampio range di titolazione dell' anticorpo che dimostri l'affidabilità del test ai diversi livelli di espressione. Inoltre deve essere monitorata costantemente nel tempo la sensibilità e la specificità della reazione con opportuni controlli interni come descritto per i prodotti IVD. Considerando la complessità dei controlli necessari per assicurare e mantenere nel tempo l'affidabilità del test LDT e le conseguenti responsabilità medico-legali per il patologo, è consigliabile optare per test IVD.

La partecipazione a controlli di qualità sulla immunoreazione per PD-L1 è anch'essa fortemente raccomandata per permettere ad ogni struttura di verificare l'attendibilità della procedura effettuata nel proprio laboratorio. Il NEQAS ed il NordiQC sono due provider internazionali che possono al momento soddisfare questa necessità.

Farmaco	Anticorpo	Epitopo	Piattaforma	Indicazioni
Pembrolizumab	22C3 Mab topo	Extracellulare	Dako Link 48	Companion#
Nivolumab	28-8 Mab coniglio	Extracellulare	Dako Link 48	Complementary
Atezolizumab	SP142 Mab coniglio	Intracellulare	Ventana Benchmark	Companion *
Durvalumab	SP263 Mab coniglio	Extracellulare	Ventana Benchmark	Complementary
Avelumab	73-10 Mab coniglio	Intracellulare	Dako	Complementary

Tab.1

# Companion Diagnostic per NSCLC- Carcinoma polmonare non a piccole cellule

\*Companion Diagnostic per TNBC- Carcinoma mammario triplo negativo

### Messaggi chiave

- L'espressione immunohistochimica della proteina PD-L1 (Programmed death ligand 1) è entrata nella pratica clinica come marcatore per la selezione dei pazienti con NSCLC da destinare a particolari trattamenti immunoterapici bloccanti l'asse PD1-PD-L1.
- E' richiesta una precisa valutazione dell'espressione di PD-L1 con metodologia validata ed affidabile per fornire un dato preciso e riproducibile.
- Sono disponibili diversi kit commerciali validati per la diagnostica in vitro ("In vitro diagnostics, IVD") e in trials clinici. E' possibile utilizzare anche test sviluppati in laboratorio ("Laboratory Developed Test, LDT") purché validati, rispetto ai kit commerciali, con criteri stringenti, tenenti conto anche dello spettro dinamico della reazione immunohistochimica.
- Data la complessità del test, soprattutto per quanto concerne la valutazione e l'interpretazione dei risultati, si raccomanda l'utilizzo di controlli di qualità interni, possibilmente sullo stesso vetrino del caso da testare e la partecipazione a controlli di qualità esterni.

### Bibliografia essenziale

Tsao MS, Kerr KM, Kockx M, et al. PD-L1 Immunohistochemistry Comparability Study in Real-Life Clinical Samples: Results of Blueprint Phase 2 Project. *J Thoracic Oncol* 13:1302-1311, 2018

Marchetti A, Barberis M, Franco R et al. Multicenter Comparison of 22C3 PharmDX (Agilent) and SP263 (Ventana) assays to test PD-L1 expression for NSCLC to be treated with Immune Checkpoint Inhibitors *J Thorac Oncol*;12:1654-1663:2017

Fitzgibbons PL, Bradley LA, Fatheree LA et al. Principles of analytic validation of immunohistochemical assays: Guideline from the College of American Pathologists Pathology and Laboratory Quality Center. *Arch Pathol Lab Med* 138:1432-43:2014

## Capitolo 8

### **PD-L1 nella pratica clinica: criticità e accorgimenti per l'analisi.**

**Paolo Graziano, Giulio Rossi, Fiamma Buttitta**

---

L'attendibilità dei risultati del test immunoistochimico per PD-L1 è strettamente correlata al monitoraggio ed al superamento di intrinseche criticità nelle fasi pre-analitica, analitica e post-analitica del processo diagnostico.

L'allestimento del materiale biologico destinato ad essere testato per l'espressione di PD-L1 non richiede speciali accorgimenti rispetto a quanto previsto per le usuali analisi di immunostochimica. Tuttavia, poiché l'interpretazione del test esige la valutazione di numerosi aspetti e fini dettagli dell'immunoreazione è necessario aver ben chiaro che una serie di punti critici durante tutto il percorso procedurale può inficiare un risultato ottimale. Di seguito vengono elencate le principali criticità.

1 Per quanto concerne la fase pre-analitica, deve essere assicurato un adeguato tempo di fissazione del materiale biologico in formalina tamponata al 10% (almeno 6 ore per le biopsie e i campioni citologici e tra 24 e 48 ore per i campioni chirurgici) ed una diffusa penetrazione del fissativo che nel caso dei campioni chirurgici può essere assicurata solo da una tempestiva gestione ed incisione a fresco del materiale per favorire la penetrazione della formalina nella lesione tumorale. Si deve infatti considerare che la velocità di penetrazione della formalina è molto limitata (circa 1 mm/ora) e che l'immunocolorazione può risultare meno intensa nelle aree mal fissate. E' opportuno, inoltre, sottolineare come eccessivi tempi di fissazione potrebbero influenzare negativamente la reazione antigene-anticorpo e conseguentemente inficiare i risultati dell'analisi.

2 E' necessario ricordare che anche i processi di decalcificazione, ai quali vengono sottoposte le biopsie ossee, possono influenzare negativamente l'antigenicità con conseguente rischio di una scorretta determinazione dell'eventuale immunoreattività delle cellule neoplastiche. Per tale motivo già in fase di accettazione, il campione dovrebbe essere sottoposto al patologo allo scopo

di valutare l'eventuale necessità di una decalcificazione. Nei casi in cui non sia possibile allontanare manualmente la componente ossea, è consigliabile procedere con una decalcificazione in EDTA, evitando soluzioni acide.

3 In considerazione della marcata eterogeneità di espressione di PDL1, è altamente consigliabile per i tumori resecati chirurgicamente procedere con un campionamento differenziato a seconda delle dimensioni della lesione neoplastica. I tumori di diametro <1cm dovrebbero essere emisezionati ed inclusi in un'unica biocassetta. Dai tumori di dimensioni intermedie (diametro <2cm) è consigliabile ottenere ampi prelievi rappresentativi dell'intera area tumorale. Nel caso di tumori di grandi dimensioni, è opportuno effettuare prelievi in punti diversi della neoplasia da includere nella medesima biocassetta: questa modalità di prelievo può consentire una valutazione più accurata sia dell'espressione di PDL1 che dell'immuno-fenotipo in senso lato (Fig1). Analogamente, anche prelievi biotipici multipli dovrebbero essere inseriti nella medesima inclusione.

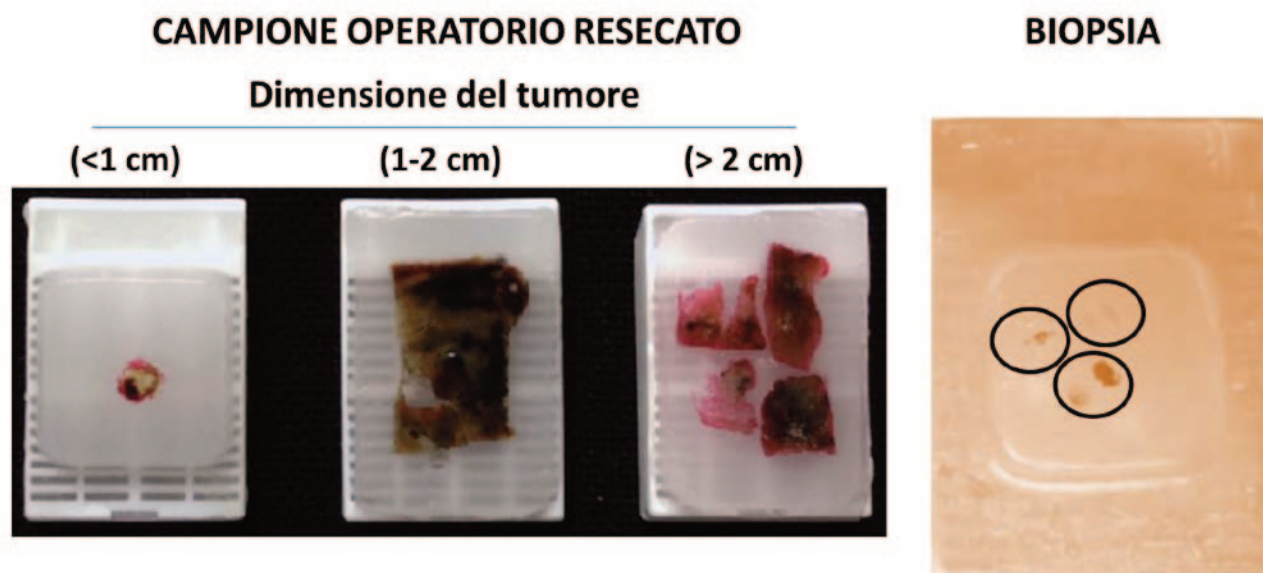


Fig.1

4 Le sezioni di tessuto, dello spessore di 3-4 m, da destinare alla valutazione dell'espressione di PDL1 dovrebbero essere allestite in stretta vicinanza temporale con la programmata esecuzione del test ed è fortemente sconsigliato l'impiego di sezioni di tessuto archiviate per un periodo superiore a due settimane in quanto si potrebbe avere un sensibile decremento dell'antigenicità. Inoltre, è opportuno che le sezioni da destinare al test PDL1 siano contigue alla sezione colorata con ematossilina/eosina, per discriminare meglio fra componente neoplastica e la componente immunitaria, soprattutto qualora quest'ultima sia esuberante.

Per quanto concerne la fase analitica, possono essere sottoposti a valutazione per l'espressione immunoistochimica di PD-L1 varie tipologie di campioni biologici includenti resecati chirurgici, biopsie e campioni citologici, purché questi ultimi siano citoinclusi in paraffina dopo fissazione in formalina tamponata, comprendenti almeno 100 cellule neoplastiche valutabili.

L'espressione di PD-L1 è determinata dalla percentuale di cellule neoplastiche vitali (tumor proportion score, TPS) che mostrino colorazione completa o parziale di membrana (non citoplasmatica) di qualsiasi intensità.

In considerazione dell'eterogeneità della popolazione cellulare presente nei differenti campioni biologici, frequentemente rappresentati da campioni citologici e/o da piccole biopsie, particolare attenzione deve essere posta all'attribuzione dell'immunoreattività esclusivamente nelle cellule neoplastiche. Infatti, variabile e confondente positività potrebbe essere osservata nella popolazione cellulare necrotica o gravata da estesi artefatti da schiacciamento, nei linfociti, negli istiociti, questi ultimi talora così intimamente associati alle cellule neoplastiche da imporre un'analisi comparativa con la sezione colorata in ematossilina-eosina ed in taluni casi suggerire l'ausilio di immunocolorazioni (CD68 per istiociti e pan-citocheratine per cellule tumorali) volte a definire con maggior precisione l'istogenesi della popolazione cellulare in analisi.

Data quindi l'importanza assegnata alla valutazione della percentuale dell'espressione di PD-L1 nel determinare l'eleggibilità del paziente ad un trattamento, particolare attenzione andrà posta nella corretta valutazione della percentuale. In particolare, laddove si osservi già a basso

ingrandimento un valore che si aggiri intorno ai limiti soglia attualmente utilizzati ( $\geq 1\%$ ;  $\geq 50\%$ ), si suggerisce di suddividere idealmente l'intera sezione in quadranti o campi con equivalente quota di cellule neoplastiche e di assegnare a ciascuno di essi la percentuale di cellule tumorali positive per PD-L1. Al termine della valutazione analitica, sarà necessario sommare le percentuali ottenute da ciascuna area e dividere il totale per il numero di aree esaminate.

Nel caso infine di una quota di cellule neoplastiche valutabili inferiore a 100, è suggerita l'esecuzione di ulteriori livelli di sezione (o la sostituzione con un'altra inclusione) ed in caso di immutato valore inferiore a 100, è consigliabile comunicare la percentuale di cellule neoplastiche positive per PD-L1 definendo però il campione come non adeguato a soddisfare i criteri di assegnazione del corretto TPS.

### Messaggi chiave

- L'espressione immunohistochimica di PD-L1 deve essere testata in tutti i casi di NSCLC in stadio avanzato (IIIB/IV), sia per istotipo squamoso che non-squamoso
- Il materiale istologico (campione operatorio, biopsia) è da preferire al materiale citologico convenzionale e va analizzato diffusamente per prevenire falsi negativi secondari all'eterogeneità di espressione
- Per un risultato ottimale, è necessario porre particolare attenzione alla fase pre-analitica e la valutazione di PD-L1 può essere determinata esclusivamente se il campione contiene almeno 100 cellule tumorali
- In considerazione della eterogeneità di espressione, in caso di campione chirurgico, si consiglia di adottare strategie di campionamento che portino a includere in una medesima biocassetta porzioni differenti e rappresentative della neoplasia.
- La positività è determinata esclusivamente dalla reazione di membrana nelle cellule neoplastiche, indipendentemente dall'intensità considerando pertanto nel computo anche cellule con debole e parziale immunoreattività.

### Bibliografia essenziale

- Thunnissen E, Allen TC, Adam J, et al. Immunohistochemistry of Pulmonary Biomarkers: A Perspective From Members of the Pulmonary Pathology Society. Arch Pathol Lab Med. 2018 Mar;142(3):408-419.
- Wang H, Agulnik J, Kasymjanova G, et al. Cytology cell blocks are suitable for immunohistochemical testing for PD-L1 in lung cancer. Ann Oncol. 2018;29:1417-1422.
- Tsao MS, Kerr KM, Dacic S, et al. IASLC Atlas of PD-L1 Immunohistochemistry Testing in Lung Cancer. Colorado, USA: International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC);2017.
- Munari E, Zamboni G, Lunardi G, et al. PD-L1 Expression Heterogeneity in Non-Small Cell Lung Cancer: Defining Criteria for Harmonization between Biopsy Specimens and Whole Sections. J Thorac Oncol. 2018 Aug;13(8):1113-1120.
- Garon EB, Rizvi NA, Hui R, et al. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. N Engl J Med. 2015 May 21;372(21):2018-28.

## Capitolo 9

### La Refertazione.

R. Franco, G. Fontanini, P. Graziano.

---

La refertazione del test immunoistochimico per la valutazione quantitativa della percentuale delle cellule neoplastiche che esprimono la proteina PD-L1 rappresenta il criterio necessario per il clinico ad indirizzare il paziente affetto da NSCLC in stadio IIIb-IV al trattamento con il farmaco anti-PD1 pembrolizumab, in prima o in seconda linea, ed il farmaco anti-PD-L1 durvalumab nei pazienti in stadio III non resecabile.

La refertazione della positività immunoistochimica del PD-L1 nei campioni di NSCLC richiede l'indicazione di una serie di informazioni fondamentali, che vanno strutturate in 5 campi: a) dati anagrafici e richiedente; b) notizie cliniche riguardanti il paziente e la sede del prelievo del campione in esame; c) la tipologia del materiale utilizzato per il test; d) il clone e la piattaforma strumentale utilizzata, facendo riferimento alla tipologia di test: IVD o LDT; e) il dato analitico di PD-L1; f) nota sul significato clinico del dato.

a) Dati Anagrafici del paziente e dei richiedenti: come in ogni referto, dovranno essere riportati le Generalità del paziente, Medico Richiedente, Struttura da cui proviene la richiesta

b) Notizie cliniche: Le informazioni cliniche del paziente devono essere pertinenti all'indagine effettuata, e devono contenere informazioni relative all'anamnesi, in particolare all'abitudine al fumo di tabacco, allo stadio clinico, all'istotipo tumorale, alla sede del prelievo, primitiva o secondaria, all'eventuale stato mutazionale degli altri marker predittivi nel NSCLC.

c) Materiale in esame: è importante specificare la tipologia di campione in esame, campione chirurgico, biopsia, campione citologico. Per quanto concerne quest'ultimo, andranno riportate le informazioni relative all'adeguatezza riportate nel capitolo precedente e cioè in breve se il test è stato effettuato su campione citoincluso/cell-block, se lo stesso è stato processato con modalità e tempi previsti per i piccoli campioni biotici e pertanto fissato in formalina e incluso in paraffina,

la quota minima di cellule neoplastiche vitali che deve essere pari o superiore a 100 .

d) Clone utilizzato: è necessario specificare il tipo di clone, considerando che i cloni riconosciuti per l'indicazione al trattamento con pembrolizumab o durvalumab, disponibili come test IVD, sono rispettivamente il 22C3 utilizzato su piattaforma Dako-Agilent e l'SP263 , utilizzato su piattaforma Roche Ventana .

e) Diagnosi immunohistochimica: valutare la positività di membrana nelle cellule neoplastiche, indipendentemente dall'intensità della colorazione ed indicare la percentuale di positività utilizzando il "Tumor Proportion Score (TPS)" rispetto alla totalità della popolazione neoplastica presente nel campione in esame .

f) Nota sul significato clinico del dato

Indicazione dell'indirizzo terapeutico in relazione alla positività riportata per l'utilizzo del farmaco pembrolizumab in prima o seconda linea di trattamento dei pazienti con NSCLC in stadio IIIb/IV:

- Score <1% (negativo): paziente non eleggibile al trattamento con anti-PD1 pembrolizumab.
- Score  $\geq 1\%$ ,  $\leq 50\%$ : paziente eleggibile al trattamento in seconda linea con anti-PD1 pembrolizumab
- Score > 50%: paziente eleggibile al trattamento in prima linea con anti-PD1 pembrolizumab.

Indicazione dell'indirizzo terapeutico in relazione alla positività riportata per l'utilizzo del farmaco durvalumab nei pazienti con NSCLC in stadio III non operabile:

- Score <1% (negativo): paziente non eleggibile al trattamento con anti-PD-L1 durvalumab
- Score  $\geq 1\%$ : paziente eleggibile al trattamento con anti-PD-L1 durvalumab

### Messaggi chiave

- Il referto deve riportare in modo inequivocabile i dati anagrafici del paziente, la sede del prelievo e la tipologia del campione
- Nella parte metodologica devono essere riportati il clone e la piattaforma strumentale utilizzata, facendo riferimento alla tipologia di test: IVD o LDT
- Il dato analitico deve contenere almeno la positività secondo i due cut-off di riferimento (1% e 50%), con commento sul significato clinico

### Bibliografia essenziale

- Teixidó C, Vilariño N, Reyes R and Reguart N, PD-L1 expression testing in non-small cell lung cancer Ther Adv Med Oncol 2018, Vol. 10: 1–17
- Kerr KM, Nicolson MC. Non-Small Cell Lung Cancer, PD-L1, and the Pathologist. Arch Pathol Lab Med. 2016;140:249–254
- M Barbareschi, M Barberis, F Buttitta, C Doglioni, M Fiorentino, G Fontanini, R Franco, A Marchetti, G Rossi, G Troncone. Predictive markers in lung cancer: a few hints for the practicing pathologist. Pathologica 110 (1), 29-38
- Ancevski Hunter K, Socinski M, Villaruz LC. PD-L1 Testing in Guiding Patient Selection for PD-1/PD-L1 Inhibitor Therapy in Lung Cancer. Mol Diagn Ther. 2018 February ; 22(1): 1–10
- Califano R, Lal R, Lewaski C, Nicolson MC, Ottensmeie CH, Popat S, Hodgson M, Postmus PE. Patient selection for anti-PD-1/PD-L1 therapy in advanced non-small-cell lung cancer: implications for clinical practice. Future Oncol. (2018) 14(23), 2415–2431

NSCCLC

