

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
CORSO DI LAUREA IN MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIRURGICHE, ONCOLOGICHE
E GASTROENTEROLOGICHE
Direttore: Prof. Umberto Cillo

TESI DI LAUREA

STUDIO PROSPETTICO SUL RUOLO DELLA BIOPSIA
LIQUIDA IN PAZIENTI CON NEOPLASIA
POLMONARE NON A PICCOLE CELLULE EGFR
MUTATA: LA CARATTERIZZAZIONE DEI PAZIENTI
CON RESISTENZA PRIMARIA A OSIMERTINIB

Relatrice: Dott.ssa Laura Bonanno

Correlatrice: Dott.ssa Alessandra Ferro

Laureando: Paolo Rossi detto Baldin

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

INDICE

ABSTRACT	1
RIASSUNTO	3
1. INTRODUZIONE: NEOPLASIA POLMONARE.....	5
1.1 EPIDEMIOLOGIA.....	5
1.2 FATTORI DI RISCHIO	9
1.3 PREVENZIONE PRIMARIA E SECONDARIA.....	11
1.4 CLASSIFICAZIONE ISTOLOGICA	13
1.5 PATOLOGIA MOLECOLARE	18
1.6 ITER DIAGNOSTICO	22
1.7 TERAPIA DEL NSCLC.....	31
1.8 BIOPSIA LIQUIDA	41
2. SCOPO DELLO STUDIO.....	44
3. MATERIALI E METODI.....	45
3.1 DISEGNO DELLO STUDIO	45
3.2 RACCOLTA E PROCESSAZIONE DEI CAMPIONI	46
3.3 ANALISI NGS	46
3.4 ANALISI DI REAL-TIME PCR.....	47
3.5 ANALISI STATISTICHE	47

4. RISULTATI	51
4.1 CARATTERISTICHE DELLA POPOLAZIONE IN STUDIO	51
4.2 DATI SUL TRATTAMENTO	53
4.3 DATI SULLA BIOPSIA LIQUIDA.....	57
4.4 FATTORI PREDITTIVI PER PROGRESSIONE PRECOCE .	61
4.5 ANALISI DELLA SOPRAVVIVENZA.....	66
5.0 DISCUSSIONE	72
6. BIBLIOGRAFIA	79

ABSTRACT

Background: Osimertinib is the current standard of care for the first-line treatment of advanced EGFR-mutant Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC). The study of primary and acquired resistance mechanisms is one of the burning issues for further improving the outcome of EGFR-mutated patients. Liquid biopsy permits to characterize and quantify the presence of tumor-related genetic alterations in plasma, it has the potential to mirror tumor heterogeneity and evolution during treatment and might be exploited to early identify patients who are likely to derive limited clinical benefit from treatment.

Objectives: This study aims to evaluate the feasibility and potential predictive role of liquid biopsy serial monitoring in EGFR-mutant NSCLC and to describe the potential predictive role of co-mutations found at baseline in plasma

Methods: In the prospective multicentre translational study REM, patients with EGFR-mutated advanced NSCLC receiving first-line Osimertinib according to clinical practice are enrolled. Liquid biopsy is performed at the time of Osimertinib start (T0), after 10 (T1) and 28 (T2) days, and upon radiological progression (T3). Plasmatic EGFR mutations are tested at each timepoint using real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). Clearance at specific timepoints is defined as the absence of detectable plasmatic EGFR mutant cfDNA. Next-generation sequencing (NGS) with 77-gene panel is performed at T0 and T3. As primary end-point we observed the compliance of enrolled patients to established procedures and the feasibility of the planned tests. As secondary end-points we associated the absence of clearance at T1 and T2 and the presence of TP53 co-mutations at baseline with the probability of developing Primary resistance, defined as progression within 6 months since the start of Osimertinib and Early progression, defined as progression disease within 9 months since the start of Osimertinib.

Results: Since August 2022, 106 patients have been enrolled, mainly females (N=59 60%) and non-smokers (N=41, 49,5%). Median age at diagnosis is 70 years

(IQR 61, 76). The majority of patients had a common EGFR mutation (Ex19del N=47, 49% and L858R, N=35, 37%). After a median follow-up of 8,45 months (95%CI 9.0-13.0), objective response rate was 67% (95%CI 54%-77%) and 15 patients (16%) experienced early progression disease. No clinical feature was associated with the risk of early progression disease, while the presence Exon 19 deletion was associated with better outcome and less risk of progression ($p=0,003$) G1-G2 Adverse events were seen in 91% of patients, G3 or more only in 8,3% of patients At the time of the current analyses, 84 (79%) patients completed all the blood sample collection from T0 to T2, 84 samples were analysed with RT-PCR and 49 with NGS and the concordance between tissue and plasma at baseline was 82%. 91 (86%) out of 106 patients enrolled performed all the planned liquid biopsies, two samples were not evaluable. Clearance of cfDNA was observed at T1 in 40 patients (53%) and at T2 in 53 pts (76%). Lack of clearance at T1 and T2 was associated with higher probability of experiencing early progression ($p=0.04$, $p=0.03$), while baseline EGFR positivity in plasma was not. NGS analysis on T0 plasma was performed on 49 patients. The most common mutation was found on *tp53* gene, which significantly correlates both with the risk of Primary Resistance and with early progression disease ($p=0,007$).

Conclusions: Our preliminary data confirm feasibility of longitudinal characterization in plasma in clinical practice. Clearance of EGFR mutation after 10 and 28 days since Osimertinb start and TP53 co-mutation were able to identify patients at risk for early progression disease. Data warrant validation for use in clinical practice decision making and are consistent with the literature references.

RIASSUNTO

Contesto dello studio: Osimertinib è l'attuale standard di cura per il trattamento di prima linea del carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC) avanzato con mutazione di EGFR. Lo studio dei meccanismi di resistenza primaria e acquisita è una delle questioni urgenti per migliorare ulteriormente l'esito dei pazienti con mutazione di EGFR. La biopsia liquida consente di caratterizzare e quantificare la presenza di alterazioni genetiche correlate al tumore nel plasma, ha il potenziale di riflettere l'eterogeneità del tumore e l'evoluzione durante il trattamento e potrebbe essere sfruttata per identificare precocemente i pazienti che probabilmente trarranno un beneficio clinico limitato dal trattamento.

Obiettivi: Questo studio mira a valutare la fattibilità e il potenziale ruolo predittivo del monitoraggio seriale mediante biopsia liquida nel NSCLC EGFR-mutato e a descrivere il potenziale ruolo predittivo delle co-mutazioni trovate al basale nel plasma.

Metodi: Nello studio traslazionale multicentrico prospettico REM, vengono arruolati pazienti con NSCLC avanzato mutato per EGFR che ricevono Osimertinib di prima linea secondo la pratica clinica. La biopsia liquida viene eseguita al momento dell'inizio di Osimertinib (T0), dopo 10 (T1) e 28 (T2) giorni e al momento della progressione radiologica (T3). Le mutazioni plasmatiche di EGFR vengono testate a ciascun punto temporale utilizzando la *real time-polymerase chain reaction* (RT-PCR). La clearance a punti temporali specifici è definita come l'assenza di cfDNA mutante di EGFR rilevabile nel plasma. Il sequenziamento di nuova generazione (NGS) con un pannello di 77 geni viene eseguito a T0 e T3. Come endpoint primario, abbiamo osservato la conformità dei pazienti arruolati alle procedure stabilite e la fattibilità dei test pianificati. Come endpoint secondari, abbiamo associato l'assenza di clearance a T1 e T2 e la presenza di co-mutazioni di *Tp53* al basale con la probabilità di sviluppare resistenza primaria, definita come progressione entro 6 mesi dall'inizio di Osimertinib, e progressione precoce, definita come progressione della malattia entro 9 mesi dall'inizio di Osimertinib.

Risultati: Da agosto 2022, 106 pazienti sono stati arruolati, principalmente femmine (N=59, 60%) e non fumatori (N=41, 49,5%). L'età mediana alla diagnosi è di 70 anni (IQR 61, 76). La maggior parte dei pazienti aveva una mutazione comune di EGFR (Ex19del N=47, 49% e L858R, N=35, 37%). Dopo un follow-up mediano di 8,45 mesi (IC 95% 9,0-13,0), il tasso di risposta obiettiva è stato del 67% (IC 95% 54%-77%) e 15 pazienti (16%) hanno sperimentato una progressione precoce della malattia. Nessuna caratteristica clinica è stata associata al rischio di progressione precoce della malattia, mentre la presenza della delezione dell'esone 19 è stata associata a un miglior esito e a un minor rischio di progressione ($p=0,003$). Eventi avversi di grado G1-G2 sono stati osservati nel 91% dei pazienti, mentre eventi avversi di grado G3 o superiore solo nell'8,3% dei pazienti. Al momento delle analisi attuali, 84 (79%) pazienti hanno completato tutte le raccolte di campioni di sangue da T0 a T2, 84 (82%) campioni sono stati analizzati con RT-PCR e la concordanza tra tessuto e plasma al basale è stata dell'82%. Dei 106 pazienti arruolati ad oggi, 91 (86%) hanno svolto tutti i prelievi programmati; complessivamente due campioni sono risultati ad oggi non valutabili. La clearance del cfDNA è stata osservata a T1 in 40 pazienti (53%) e a T2 in 53 pazienti (76%). La mancanza di clearance a T1 e T2 è stata associata a una maggiore probabilità di sperimentare una progressione precoce ($p=0,04$, $p=0,03$), mentre la positività di EGFR al basale nel plasma non lo è stata. L'analisi NGS sul plasma T0 è stata eseguita su 49 (47%) pazienti. La mutazione più comune è stata trovata sul gene *Tp53*, che correla significativamente sia con il rischio di resistenza primaria sia con la progressione precoce della malattia ($p=0,007$).

Conclusioni: I nostri dati preliminari confermano la fattibilità della caratterizzazione longitudinale nel plasma nella pratica clinica. La clearance della mutazione EGFR dopo 10 e 28 giorni dall'inizio di Osimertinib e la co-mutazione di TP53 sono state in grado di identificare i pazienti a rischio di progressione precoce della malattia. I dati richiedono una validazione per l'uso nella decisione clinica e sono coerenti con le referenze della letteratura.

1. INTRODUZIONE: NEOPLASIA POLMONARE

1.1 EPIDEMIOLOGIA

La neoplasia polmonare risulta essere la prima per incidenza a livello mondiale in entrambi i sessi e tutte le età secondo i dati dello IARC Globocan del 2022 con 2.48 milioni di casi registrati (12,4% del totale delle diagnosi di neoplasia), seguita dal cancro alla mammella (11,5%), colon-retto (9,6%), prostata (7,3%), stomaco (4,8%) e fegato (4,3%) (1).

Il sesso maschile ha recentemente visto un sorpasso della neoplasia polmonare nei confronti del cancro alla prostata per quanto riguarda l'incidenza assoluta (15,2% vs 14,2%).

Il sesso femminile, invece, presenta tutt'ora un netto primato di incidenza per il cancro alla mammella con 2,3 milioni di casi (23,8%), contro gli 0,9 milioni della neoplasia polmonare (9,4%) (1).

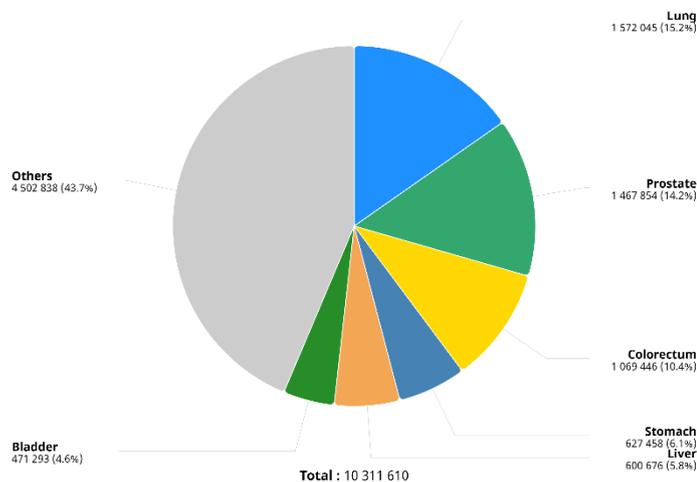


Figura 1: Incidenza delle neoplasie più frequenti nel sesso maschile.

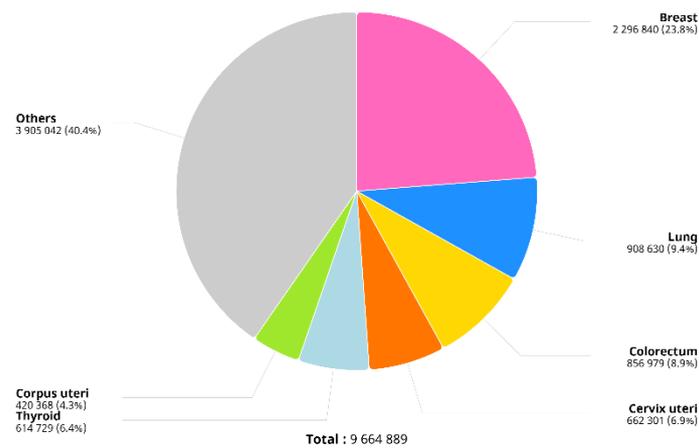


Figura 2: Incidenza delle neoplasie più frequenti nel sesso femminile.

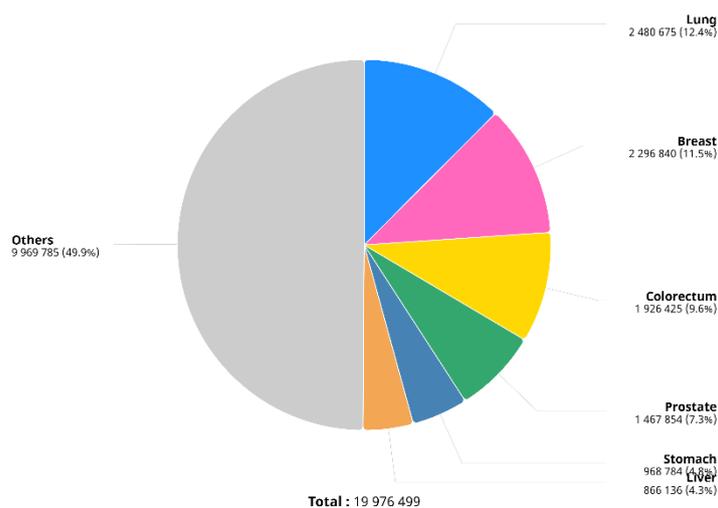


Figura 3: Incidenza delle neoplasie più frequenti in ambo i sessi.

La mortalità della neoplasia polmonare rappresenta un dato ancora più preoccupante, in quanto si stima un valore di 1,8 milioni di decessi dovuti al cancro al polmone nel 2022 su un totale di 9,8 milioni di morti per tutte le neoplasie.

Il sesso maschile evidenzia una supremazia ancora maggiore della neoplasia polmonare come primo killer, attestando una mortalità del 22,7% sul totale delle morti

per neoplasia, mentre nel sesso femminile il primato rimane al cancro alla mammella con una mortalità del 15,4% sul totale e il polmone segue al 13,5% (1).

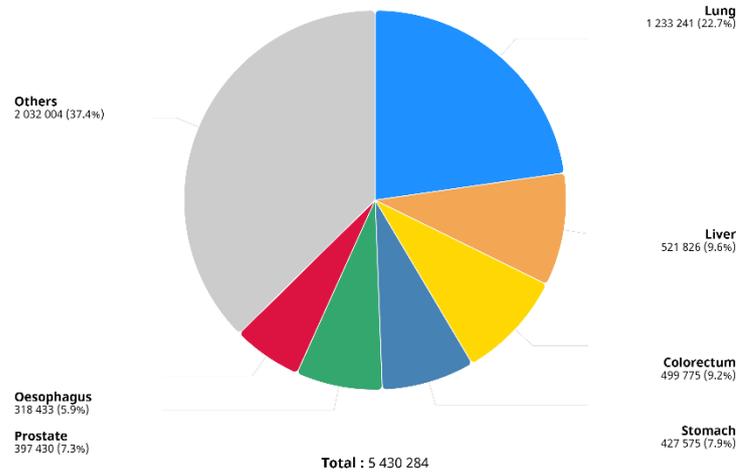


Figura 4: Mortalità delle neoplasie più frequenti nel sesso maschile.

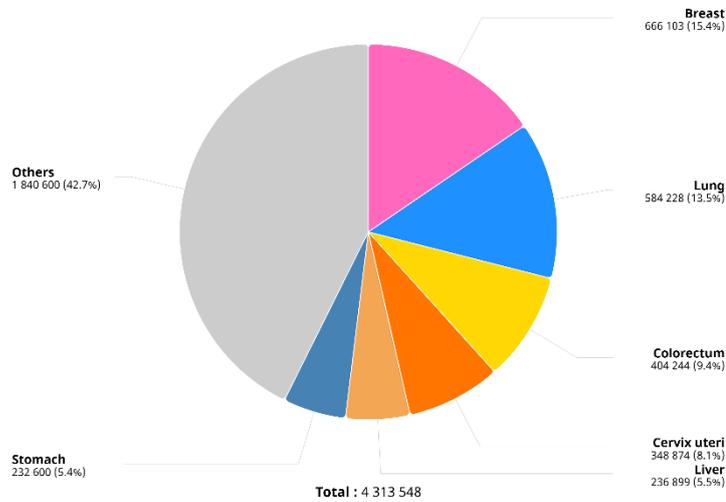


Figura 5: Mortalità delle neoplasie più frequenti nel sesso femminile.

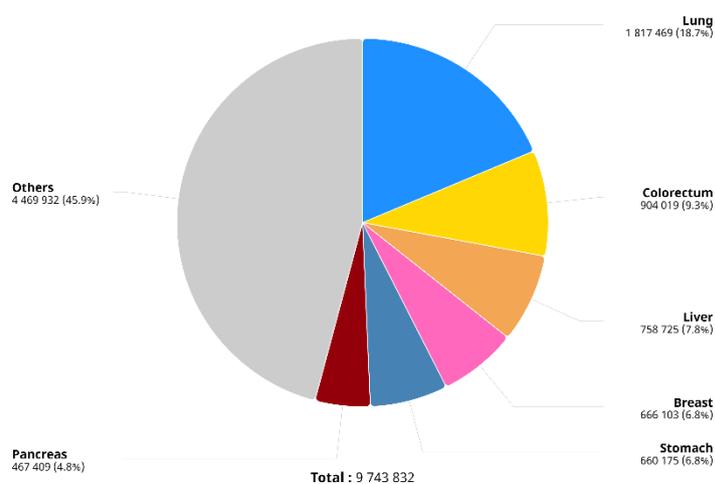


Figura 6: Mortalità delle neoplasie più frequenti in ambo i sessi.

La distribuzione geografica dell'incidenza della malattia, così come le sue variazioni nel tempo sono principalmente legate al suo principale fattore di rischio: il fumo di sigaretta.

Per quanto riguarda la distribuzione geografica, l'incidenza e la mortalità del tumore al polmone, valutate secondo lo stato politico-economico dei vari paesi mondiali, sono dalle 3 alle 4 volte superiori nei paesi con un'economia sviluppata (elevato *Human Development Index* – HDI) (3). Tuttavia, questo andamento potrebbe cambiare in quanto l'80% dei fumatori di tabacco con età >15 anni risiede nei paesi a medio-basso reddito (4)

In Italia sono stati stimati circa 41.000 nuovi casi di tumore al polmone (27.550 negli uomini e 13.300 nelle donne): I decessi si attestano a circa 34.000 nel 2017, di cui 23.400 negli uomini e 10.000 nelle donne. Il trend è nettamente in calo per gli uomini (-11,2%) e in aumento per le donne (+5,2%) (5).

L'età è un fattore molto importante nel determinare l'insorgenza della neoplasia polmonare, in quanto nella fascia tra i 50-69 anni e negli ultrasettantenni è la seconda più frequente dopo quella alla prostata. Questi dati indicano che è una patologia soprattutto dell'anziano.

Anche l'istologia delle neoplasie polmonari è mutata nel tempo, passando da un picco importante di carcinoma squamoso negli anni 80' e 90' (17 su 100.000

persone/anno) alla supremazia dell'adenocarcinoma, dopo gli anni 90'. Gli altri sottotipi più rari, come il microcitoma e il carcinoma a grandi cellule presentano dei trend in lieve diminuzione (6).

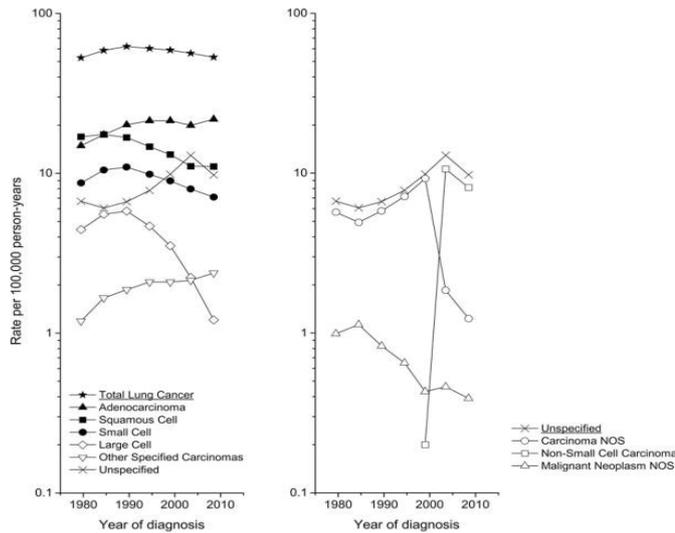


Figura 7: I trend nel corso degli anni dell'incidenza dei principali istotipi del tumore al polmone.

1.2 FATTORI DI RISCHIO

I fattori di rischio per lo sviluppo di neoplasia polmonare sono numerosi. Il più importante e prevenibile è sicuramente il fumo di sigaretta, che statisticamente rende conto di circa 2/3 di tutte le morti per tumore polmonare (7, 8). Tra i fattori prevenibili si individuano anche la dieta, in cui è importante il ruolo protettivo delle crucifere e negativo del consumo di carne rossa e di alcol (9, 10, 11.). Importanti anche le patologie croniche infiammatorie delle vie respiratorie, sia di natura restrittiva che ostruttiva: BPCO, asma, enfisema e bronchite sono le maggiormente associate a neoplasia polmonare. Associazioni meno forti si registrano per la tubercolosi (13, 14, 15, 16). Rare, ma rilevanti le esposizioni alle radiazioni ionizzanti, all'asbesto e altri metalli che irritano il parenchima polmonare (17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24), nonché l'inquinamento atmosferico, sia *indoor* e quindi basato su pratiche di cottura errate all'interno delle abitazioni, che *outdoor*, dovuto a livelli

pericolosi di PM_{2.5} e PM₁₀ (25, 26, 27, 28) Esistono anche fattori genetici, i quali vanno dalla semplice storia familiare senza evidenza di mutazioni identificabili, alla presenza di polimorfismi in specifici loci genici e patologie monogeniche come la sindrome di Li-Fraumeni (29, 30, 31, 32, 33).

1.2.1 FUMO DI SIGARETTA

L'utilizzo di tabacco è il fattore di rischio principale per lo sviluppo di cancro al polmone. Si stima che nel 2012 abbia causato 226.000 nuove diagnosi di neoplasia polmonare e 160.000 decessi come conseguenza diretta del tumore nei soli Stati Uniti d'America (34).

Il picco per l'uomo si è raggiunto alla fine degli anni 90' e ora sta lentamente riducendosi grazie alle campagne antitabacco, mentre per le donne la situazione è ancora in ascesa, a causa di un'iniziazione più tardiva all'abitudine voluttuaria tabagica e dunque una maggiore difficoltà alla sua cessazione (35).

Il rischio relativo dei fumatori rispetto ai non fumatori si attesta intorno a 14, mentre se si considerano i forti fumatori (coloro che fumano oltre 20 sigarette al giorno), il rischio arriva a 20 (36). Tuttavia, questo rischio non è costante per tutta la vita, ma si riduce significativamente se si interrompe l'abitudine voluttuaria, anche se permane elevato per gli *heavy smokers* anche dopo 25 anni dall'ultima sigaretta (37).

Attualmente la situazione in Italia, secondo uno studio del 2019, evidenzia un decremento del numero di fumatori, che si attestano intorno al 22% (28% uomini e 16,5% donne) dell'intera popolazione rispetto al 23,3% del 2018. Il vizio si sviluppa in età adolescenziale, tra i 15 e i 20 anni e poi viene mantenuto fino all'anzianità: l'età media dei fumatori in Italia è di 45,3 anni (38).

La fisiopatologia del danno da fumo di sigaretta non è ancora stata determinata del tutto, in quanto degli oltre 9.000 agenti chimici contenuti nel tabacco raffinato industrialmente, solo 80 sono stati individuati come sicuri o possibili cancerogeni (39).

Le componenti cancerogene principali sono gli idrocarburi aromatici policiclici (PAH), che si formano dalla combustione incompleta del tabacco. Inoltre, le aldeidi,

tra cui la formaldeide, l'acroleina, l'acetaldeide e la crotonaldeide, sono tra gli elementi cancerogeni che si formano in quantità maggiore dalla combustione del tabacco (40).

Negli ultimi anni è aumentato sempre di più il fenomeno delle sigarette elettroniche, device che insufflano nicotina e altre sostanze psicoattivi tramite aerosol. All'interno degli aerosol delle sigarette elettroniche sono presenti umettanti (propilene glicolo e glicerina) che in seguito a combustione producono sostanze cancerogene a base di carbonio, come la formaldeide e l'acroleina (41).

1.3 PREVENZIONE PRIMARIA E SECONDARIA

La prevenzione primaria legata al tumore al polmone consiste in tutte le attività atte a limitare l'esposizione del paziente agli agenti cancerogeni descritti nei paragrafi precedenti. In particolare, sono fondamentali le campagne di controllo sul fumo, le quali sono cominciate in Italia nel 2005 a seguito dell'emanazione del programma MPOWER da parte della WHO (World Health Organization). Successivamente i divieti si sono fatti ancora più stringenti con una legge del 2013 finalizzata a proibire l'utilizzo di sigarette et similia all'interno delle scuole, spiagge e parchi pubblici. A partire dal 2016 vengono riportate immagini shock che dimostrano gli effetti dannosi del fumo di sigaretta direttamente sui pacchetti, per cercare di sensibilizzare soprattutto i più giovani ai rischi del fumo e creare uno stigma sociale nei confronti di questa attività voluttuaria che ne riduca sempre di più l'appeal (5).

Le strategie messe in atto per interrompere l'abitudine tabagica consistono in un'associazione di supporto comportamentale e farmacoterapia. In particolare, i farmaci maggiormente utilizzati per combattere la dipendenza dalla nicotina sono il bupropione e la vareniclina (42).

L'utilizzo della sigaretta elettronica si è rivelato utile per ridurre l'utilizzo delle sigarette normali rispetto ai dispositivi NRT (*Nicotine Replacement Therapy*), ma soltanto se all'interno della miscela fosse presente la nicotina. Inoltre, circa 1/3 dei pazienti che utilizzano questo metodo continuano ad utilizzare la sigaretta elettronica a più di un anno di distanza (43, 44).

La prevenzione secondaria consta di tutte le attività finalizzate a raggiungere una diagnosi precoce della malattia, quando è ancora in una fase asintomatica e trattabile. Il tumore al polmone sta cominciando solo negli ultimi anni a presentare programmi di screening che possano essere applicati alle popolazioni maggiormente a rischio.

Il primo studio a supportare la possibilità di eseguire delle TC torace a bassa dose in soggetti ad alto rischio (55-74 anni, fumatori o ex-fumatori entro 15 anni dall'arruolamento) al fine di effettuare una diagnosi precoce di malattia e ridurre la mortalità è stato effettuato nel 2011 dal *National Lung Screening Trial Research Team* negli Stati Uniti. Si individua una riduzione della mortalità del 20% nel gruppo dei pazienti studiati mediante TC rispetto a quelli screenati tramite radiografia del torace (5, 45).

Nel decennio successivo si sono susseguiti altri studi indipendenti atti a confermare i risultati ottenuti precedentemente, fino a giungere nel 2021 ad uno *statement* da parte della *US Preventive Services Task Force* in cui si definiscono i punti principali dello screening per la neoplasia polmonare: i pazienti aggregabili devono avere un'età compresa tra i 50 e gli 80 anni, fumatori o ex-fumatori da massimo 15 anni, con una storia di fumo di almeno 20 *pack-year*. Il metodo radiologico da utilizzare è la TC torace a basse dosi annuale. Fondamentale associare i programmi di cessazione dell'abitudine tabagica al programma di screening, che altrimenti non determinerebbe una riduzione della mortalità tale da giustificare i costi dello screening stesso (46).

Attualmente in Europa lo screening non è garantito gratuitamente dai sistemi sanitari nazionali; tuttavia, si sta lavorando sia sul piano nazionale (ad esempio, in Italia è presente la RISP – Rete Italiana per lo Screening Polmonare) che sul piano sovranazionale per mettere in atto il prima possibile un programma ottimizzato di diagnosi precoce del tumore al polmone (47).

1.4 CLASSIFICAZIONE ISTOLOGICA

La classificazione istologica utilizzata dagli anatomopatologi per descrivere le neoplasie polmonari è la V edizione del *bluebook* della WHO (*World Health Organization*) aggiornata al 2021.

La diagnosi istologica si basa inizialmente sulla valutazione morfologica, per poi applicare delle tecniche di indagine immunohistochimica e infine le tecniche molecolari (49).

Nonostante siano stati individuate numerose sottocategorie di neoplasia polmonare, il 95% dei decessi viene determinato da quattro istotipi principali:

- **Microcitoma:** detto anche carcinoma a piccole cellule (SCLC)
- **Carcinoma squamoso (CS)**
- **Adenocarcinoma (ADC)**
- **Carcinoma a grandi cellule (CGC)**

Gli ultimi tre compongono la macrocategoria degli NSCLC, ovvero i carcinomi non a piccole cellule, che si differenziano nettamente dal microcitoma sia per comportamento, che per classificazione e approccio terapeutico (5).

Tumore	Lesione precursore	Varianti	Note
Papillomi	-	Squamoso esofitico, Squamoso invertito, Ghiandola Misto, squamoso e ghiandola	Comportamento benigno
Adenomi	-	Alveolare, Papillare, Bronchiolare/tumore papillare ciliato muco nodulare, Cistoadenoma mucinoso, A ghiandole mucinose	Comportamento benigno
Adenocarcinoma	Iperplasia adenomatosa atipica (AAH); adenocarcinoma in situ (AIS) e minimamente invasivo (MIA) mucinoso e nonmucinoso	Pattern lepidico, acinare, papillare, micro-papillare, solido Mucinoso Fetale (basso/alto grad) Enterico Colloide	Importanza delle dimensioni: AAH \leq 5 mm AIS \leq 3 cm senza invasione stromale MIA \leq 3 cm con invasione stromale \leq 5 mm
Carcinoma squamocellulare	Displasia e carcinoma squamoso in situ	Cheratinizzante Non-cheratinizzante Basaloide	
Carcinoma a grandi cellule	-	-	Negativo per marcatori di differenziazione squamosa (p40, CK5/6), adenocarcinoma (TTF1, napsina) e neuroendocrini
Carcinoma adenosquamoso	-	-	Le componenti squamosa e ghiandola devono essere commiste tra loro ed evidenti morfologicamente
Carcinoma sarcomatoide	-	A cellule fuse, A cellule giganti, A cellule fuse e giganti, Pleomorfo (con componente convenzionale di NSCLC) accanto a componente a cellule fuse e/o giganti, Carcinosarcoma (presenza di NSCLC convenzionale accanto a sarcoma: osteo/condro/leiomio/radbo/angio-sarcoma), Blastoma	
Tumori neuroendocrini	Iperplasia idiopatica diffusa delle cellule neuroendocrine (DIPNECH) (solo per alcuni carcinoidi periferici)	Carcinoide tipico, Carcinoide atipico, Carcinoma neuroendocrino a grandi cellule, Carcinoma a piccole cellule, Carcinomi neuroendocrini combinati con NSCLC	Indice mitotico, necrosi e morfologia delle cellule sono i criteri classificativi Ki67 molto utile soprattutto nelle biopsie con artefatti
Metastasi	-		

Tabella I: Classificazione dei principali tumori polmonari secondo la V edizione del bluebook della WHO aggiornata al 2021 (48)

1.4.1 ADENOCARCINOMA

L'adenocarcinoma è una neoplasia epiteliale caratterizzata da differenziazione ghiandolare. L'aspetto morfologico può variare secondo il grado di differenziazione, cioè di conservazione della struttura ghiandolare di origine. Le forme meno differenziate vengono ricondotte ad un'origine adenocarcinomatosa basandosi sulla produzione di mucina o sull'espressione di specifici marcatori (50). Presenta una grande varietà di pattern di crescita, tra cui l'acinare, il papillare, il lepidico, il solido e il cribriforme, ma l'80% degli adenocarcinomi cade nella categoria mista, ovvero il singolo tumore presenta due o più pattern di crescita contemporaneamente (49).

Le lesioni precursori dell'adenocarcinoma secondo la nuova classificazione della WHO sono l'iperplasia adenomatosa atipica (AAH), l'adenocarcinoma in situ (AIS), l'adenocarcinoma minimamente invasivo (MIA) (48).

Le indagini immunoistochimiche sono molto utili per individuare l'adenocarcinoma, in particolare per avere una diagnosi di certezza il gold standard è la rilevazione del marcatore TTF1, alla quale si può associare la ricerca della Napsina-A, che in alcuni studi clinici ha dimostrato una migliore sensibilità (51).

Radiologicamente, l'adenocarcinoma ha una presentazione tipicamente periferica (50), mentre epidemiologicamente è più frequente degli altri istotipi nelle donne e nei non fumatori. La sua incidenza relativa rispetto agli altri istotipi è in costante incremento (3).

1.4.2 CARCINOMA SQUAMOCELLULARE

Il carcinoma squamoso è una neoplasia maligna che mostra caratteristiche di differenziazione epidermoidi. Il grado di differenziazione del tumore a seconda delle caratteristiche che vengono evidenziate all'analisi istologica, tra cui la presenza di ponti cellulari e cheratinizzazione. I tumori differenziati presentano un'organizzazione cellulare pavimentosa, ordinata, con nuclei ovali e contorni ben definiti,

mentre quelli scarsamente differenziati sono caratterizzati da atipie cellulari, attività mitotica elevata e aree di necrosi o emorragie (50).

I pattern di crescita sono cheratinizzante, non cheratinizzante e basaloide, tra cui quest'ultimo presenta un andamento peggiore in termini di prognosi (49).

Le lesioni pre-invasive possono essere la displasia squamosa e la presenza di carcinoma squamoso in situ (48).

L'immunoistochimica viene raccomandata come indagine per differenziare più precisamente l'istotipo squamoso dall'adenocarcinoma. Attualmente, p40 è il marcatore di scelta per individuare la variante squamocellulare, perché più sensibile del p63, usato in precedenza (51).

La sede più frequente del carcinoma squamoso è centrale e spesso ostruisce il lume bronchiale, ma in circa 1/3 dei casi si localizza perifericamente (50).

Viene diagnosticato soprattutto in forti fumatori e rappresenta ancora, nonostante un calo di incidenza negli ultimi decenni, 1/3 di tutti i casi di tumore al polmone (3).

1.4.3 CARCINOMA A GRANDI CELLULE

Neoplasia definita in passato anaplastica, in quanto composta da cellule grandi scarsamente differenziate e prive di marcatori immunoistochimici tipici dell'adenocarcinoma, del carcinoma squamocellulare, o dei tumori neuroendocrini. Istologicamente si individuano cellule con nuclei ovaliformi, nucleoli prominenti, attività mitotica intensa e marcata atipia. Una caratteristica distintiva di questa neoplasia è la presenza di abbondante infiltrato infiammatorio localizzato nello stroma tra le cellule tumorali (50).

Attualmente non sono state individuate varianti e neppure lesioni precancerose (48, 49).

Rappresenta meno del 10% di tutti i tumori al polmone diagnosticati (3).

1.4.4 MICROCITOMA (SCLC)

Il carcinoma a piccole cellule è caratterizzato dalla proliferazione di cellule di dimensioni ridotte, con scarso citoplasma, cromatina molto densa e nucleoli assenti. Le cellule si dispongono in modo caotico e solitamente risultano separate da setti fibrosi con necrosi diffusa. Il grado di differenziazione può variare all'interno della medesima massa tumorale, in quanto è un tumore istologicamente pleomorfo in molti casi (50).

L'immunoistochimica del microcitoma si basa sull'utilizzo di marcatori neuroendocrini, i quali possono essere positivi anche nei carcinoidi polmonari o nei tumori neuroendocrini a grandi cellule, che presentano, però, un quadro istologico solitamente ben distinguibile dal SCLC. Il marcatore più sensibile è CD56, ma è fondamentale associare questa indagine con le caratteristiche morfologiche, in quanto può essere espresso anche da cellule neuromuscolari ed ematopoietiche benigne. La malattia è tipicamente caratterizzata da un elevato indice proliferativo ed elevata attività mitotica e può esprimere anche sinaptofisina e cromogranina A (51).

Gli SCLC si localizzano tipicamente a livello centrale, portando ad ostruzione bronchiale. Hanno una tendenza molto rapida a metastatizzare a distanza e possono causare numerose sindromi paraneoplastiche, tra cui la sindrome da ipersecrezione di ADH, la sindrome di Cushing e la Lambert-Eaton (50).

È fortemente associato all'abitudine tabagica e ha un tasso di sopravvivenza molto più basso degli altri istotipi (3, 5).

1.4.5 ISTOTIPI RARI DI TUMORE AL POLMONE

Il carcinoma adenosquamoso presenta caratteristiche comuni sia all'adenocarcinoma che al carcinoma squamocellulare. Al fine di porre diagnosi è necessario che almeno il 10% di entrambi gli istotipi sia presente sul vetrino (50).

L'andamento clinico è peggiore rispetto agli altri NSCLC (8).

La definizione di Carcinoma sarcomatoide include invece una categoria molto eterogenea di neoplasie con una componente di differenziazione mesenchimale, che comprende vari sottotipi (a cellule fusate, a cellule giganti, pleomorfo, carcinosarcoma, blastoma) (48).

Altre neoplasie epiteliali più rare sono neoplasie caratterizzate dal riarrangiamento di *nut* e neoplasie di derivazione delle ghiandole salivari (mucoepidermoide e adenoidocistico) (48) (50).

1.5 PATOLOGIA MOLECOLARE

La maggior parte dei pazienti affetti da neoplasia polmonare viene trattata quando la patologia è già ad uno stadio avanzato o localmente avanzato. In questo contesto, la caratterizzazione molecolare del tumore è fondamentale per ricercare eventuali geni mutati suscettibili a terapia sistemica a bersaglio molecolare (52).

Le alterazioni geniche che vengono routinariamente testate da pratica clinica comprendono: mutazioni sensibilizzanti di *Egfr* (*Epidermal Growth Factor Receptor*) riarrangiamenti del gene *Alk* (*Anaplastic Lymphoma Kinase*) e *Ros1*, mutazioni V600 di *B-raf*. Queste alterazioni sono ad oggi indispensabili per decidere la strategia terapeutica di prima linea nella malattia avanzata. Devono inoltre essere indagate: la presenza di mutazione G12C di *K-ras* (*Kristen Rat Sarcoma Virus*), riarrangiamenti di *Ret* e *Ntrk 1-2* (*Neurotrophic Tyrosine Receptor Kinase*), mutazione exon skipping 14 di *Met* (*Mesenchymal Epithelial Transition*) (5, 52, 53).

Inoltre, è indispensabile la quantificazione dell'espressione di PD-L1 (*Programmed Cell Death Ligand*), che ha un ruolo nei criteri decisionali sul trattamento di prima linea in assenza di alterazioni driver di EGFR, ALK, ROS1 (52).

1.5.1 EGFR

EGFR appartiene ad una famiglia di recettori tirosin-chinasici che include anche HER2, HER3 e HER4. L'attivazione della *pathway* molecolare di EGFR porta alla proliferazione cellulare, sopravvivenza, invasione e angiogenesi cellulare. Le

mutazioni a livello di questo recettore comportano un'attivazione costitutiva della cascata molecolare, favorendo il processo di cancerogenesi (54).

Le mutazioni di *Egfr* sono riscontrate in circa il 10-20% di NSCLC di istotipo non squamoso e di etnia caucasica, mentre sono più frequenti negli asiatici (sino al 50%⁹). Inoltre, l'incidenza delle mutazioni di *Egfr* risulta circa tripla nei non fumatori rispetto ai fumatori (55).

La maggioranza delle mutazioni che costituiscono bersaglio per la terapia biologica ricade in due categorie: delezioni *in-frame* dell'esone 19 (ex19del) e la sostituzione L858R localizzata all'interno dell'esone 21. (52) Le altre mutazioni vengono considerate rare e spesso risulta difficile prevedere la loro risposta ai TKI (*Tyrosine Kinase Inhibitors*), la quale in alcuni studi sembra essere sostanzialmente minore in confronto alle mutazioni più frequenti (56). Tra queste, le più frequenti sono alterazioni dell'esone 18 (E709X, G719X), inserzioni dell'esone 20 e la mutazione L861Q dell'esone 21 (52).

Le mutazioni vengono comunemente testate su tessuto (o plasma) mediante sequenziamento genico tradizionale (Sanger), real-time PCR (*Polymerase Chain Reaction*) o NGS (*Next Generation Sequencing*).

1.5.2 ALK

Il recettore tirosin-chinasico ALK ha delle funzioni poco chiare nella fisiologia cellulare umana, tuttavia un suo riarrangiamento con EML4 (*Echinoderm Microtubule-associated protein-Like 4*), o altri partner più rari porta alla formazione di una proteina intracellulare coinvolta in vari processi di sopravvivenza e proliferazione cellulare (54).

La traslocazione di *Alk* si verifica in circa il 5-8% degli NSCLC e, come EGFR, è tipica delle donne, giovani, non fumatrici (55).

ALK si attiva esclusivamente tramite traslocazione, ma ha una pletora di mutazioni secondarie che possono rendere inefficaci i principali inibitori utilizzati nella pratica clinica, tra cui la più frequente è la G1202R.

La fusione di *Alk* viene testata su tessuto mediante NGS, che comprende le alterazioni più comuni. In alternativa, si può effettuare un primo screening con l'immunostochimica da confermare con metodiche di secondo livello (FISH, RT-PCR, NGS) per i pazienti che risultano 1 o 2+ (5).

1.5.3 ROS1

Ros1 è un gene che codifica per un recettore con attività tirosin-chinasica, il quale al pari di ALK diviene costitutivamente attivo in seguito ad un riarrangiamento con un'altra proteina, come CD74, esitando in una iperattivazione di numerose *pathway* di proliferazione e sopravvivenza cellulare (54).

Questa traslocazione si verifica nell'1-2% degli NSCLC diagnosticati ed è altresì maggiormente frequente nei non fumatori di sesso femminile (55).

Vi è un'alta omologia tra i domini delle chinasi *ros1* e *alk*, per cui i farmaci utilizzati per l'uno sono tipicamente efficaci anche nell'altro (54), e anche nel caso di *ros1* si registrano numerose mutazioni di resistenza (ad esempio G2032R, D2033N, L2155S) ai principali inibitori tirosinchinasici (TKI) (59, 60).

La ricerca di *Ros1* viene effettuata mediante l'utilizzo dell'immunostochimica, la cui positività richiede però conferma tramite la FISH stessa anche per i pazienti 3+, in quanto sono molto frequenti i falsi positivi. Negli ultimi anni si utilizza sempre di più l'NGS (5).

1.5.4 BRAF

Si tratta di un gene che codifica per la proteina B-RAF, la quale appartiene al gruppo delle serina/treonina-protein chinasi. La mutazione attivante principale della proteina è la V600E, la quale comporta un'attivazione costitutiva della proteina e conseguente aumento dell'attività di proliferazione cellulare (54).

La traslocazione riguarda l'1-5% degli NSCLC ed è entrata recentemente nel pannello di geni da screenare grazie alla scoperta dell'efficacia della terapia di

combinazione tra inibitori di BRAF (vemurafenib e dabrafenib) e gli inibitori di MEK (trametinib) (5, 55).

La terapia a bersaglio molecolare ha dimostrata efficacia solo in presenza di mutazione V600, che viene ricercata mediante sequenziamento standard o più frequentemente NGS (61).

1.5.5 ALTRE ALTERAZIONI A BERSAGLIO MOLECOLARE CON RISVOLTO TERAPEUTICO

Le mutazioni che coinvolgono l'esone 14 di *Met*, tra cui la principale è l'*exon skipping*, comportano un'iperespressione di questo recettore (54). Si tratta di un'alterazione che si associa ad un'età più elevata delle precedenti ed ha maggior probabilità di associarsi al fumo di sigaretta.

La traslocazione rappresenta il 2-3% degli adenocarcinomi ed è frequente soprattutto nei pazienti anziani. Si può trattare con TKI specifici, attualmente indicati a progressione dopo chemio-immunoterapia (55).

Le traslocazioni di *Ret* sono responsabili per circa l'1-2% degli NSCLC e hanno un'epidemiologia più simile a EGFR, ALK e ROS-1 in quanto è più frequente nelle donne, giovani, non fumatrici (55).

Gli *Ntrk* sono geni che codificano per specifici recettori chinasi della tropomiosina, i quali sono mutati molto raramente negli NSCLC (<1%), ma i pochi pazienti che presentano questa alterazione rispondono molto bene ad entrectinib e larotrectinib (54, 62).

Le mutazioni di *K-ras* invece sono molto frequenti negli NSCLC non squamosi, costituendo il 15-30% del totale. Sono tipiche soprattutto dei fumatori, ma sono state rilevate anche in pazienti non fumatori con pattern diversi: i tumori indotti dal tabacco solitamente presentano la mutazione G12C, mentre in quelli dei non fumatori si individua la variante G12D (54, 63).

Attualmente sono state sviluppate terapie a bersaglio molecolare solo per la mutazione G12C (54).

1.5.9 PD-L1 E PD-1

Un'altra caratteristica fondamentale delle neoplasie, e quella al polmone non fa eccezione, è la capacità di eludere la risposta immunitaria dell'ospite mediante l'iperpressione di recettori che bloccano la cascata di attivazione dei leucociti. Le molecole più importanti in questo processo sono PD-1 e il corrispondente ligando PD-L1. In particolare, PD-1 è tipicamente espresso sulla membrana dei linfociti T attivati, mentre PD-L1 viene espresso dalle cellule tumorali. Quando avviene l'interazione tra queste due proteine, la risposta citotossica del linfocita T viene inibita e la cellula tumorale riesce a sopravvivere (64).

Negli ultimi anni sono stati sviluppati degli anticorpi monoclonali diretti specificamente contro PD-L1 (atezolizumab, durvalumab, avelumab) e PD-1 (pembrolizumab, nivolumab, cemiplimab), i quali impediscono l'interazione tra il recettore e il suo ligando, permettendo ai linfociti T attivati di eliminare le cellule neoplastiche (54).

La valutazione dei livelli di espressione di PD-L1 è fondamentale per individuare i pazienti affetti da NSCLC in stadio avanzato che siano eleggibili ad un trattamento di prima linea con la sola immunoterapia. In questo caso, il risultato dell'indagine non è un valore dicotomico (positivo o negativo) come nel caso delle neoplasie *oncogene-addicted*, bensì si inserisce in uno spettro continuo espresso in percentuale: per la I linea di trattamento il campione biotico del paziente deve presentare una positività a PD-L1 maggiore o uguale al 50% delle cellule neoplastiche valutate secondo il *Tumor Proportional Score* su un totale di almeno 100 cellule (64).

1.6 ITER DIAGNOSTICO

L'iter diagnostico della neoplasia polmonare può variare molto, in quanto alcune diagnosi, soprattutto agli stadi iniziali in cui il paziente risulta ancora asintomatico, viene effettuata accidentalmente mediante un esame radiologico richiesto per altri motivi, oppure grazie ai nuovi programmi di screening (65).

Negli stadi più avanzati spesso compaiono dei sintomi che portano il medico a sospettare la possibile presenza di neoplasia. In questi casi è fondamentale procedere con un'indagine anamnestica approfondita sui fattori di rischio, eseguire un esame obiettivo accurato e valutare le comorbidità del paziente. Successivamente si inizia con la stadiazione radiologica mediante TC, PET-TC e RMN e in parallelo si valutano la funzionalità renale, epatica e cardiopolmonare, al fine di stabilire la fattibilità dei diversi approcci terapeutici. Infine, è fondamentale procedere con la biopsia della massa principale utilizzando la tecnica più opportuna in base alla localizzazione del tumore, all'eventuale coinvolgimento linfonodale e alla presenza di metastasi a distanza (5).

1.6.1 SINTOMATOLOGIA

Circa il 10% dei tumori al polmone risulta asintomatico alla diagnosi, mentre il 90% dei pazienti presenta qualche tipo di sintomo. I sintomi possono essere aspecifici, come astenia, anoressia, perdita di peso, oppure causati direttamente dalla massa tumorale, sia in ambito intratoracico che extra toracico. In alcuni casi si rendono evidenti anche delle sindromi paraneoplastiche dovute al rilascio di sostanze bioattive da parte della neoplasia (67). Le neoplasie possono essere centrali o periferiche: le neoplasie centrali sono definite come masse che si trovano entro 2 cm in tutte le direzioni da strutture mediastiniche critiche (albero bronchiale, esofago, cuore, plesso brachiale, midollo spinale, nervo frenico, nervo laringeo ricorrente).

Common Lung Cancer Manifestations

Primary tumor

Chest discomfort

Cough

Dyspnea

Hemoptysis

Intrathoracic spread

Chest wall invasion

Esophageal symptoms

Horner syndrome

Pancoast's tumor

Phrenic nerve paralysis

Pleural effusion

Recurrent laryngeal nerve paralysis

Superior vena cava obstruction

Extrathoracic spread

Bone pain, fracture

Confusion, personality change

Elevated alkaline phosphatase level

Focal neurologic deficits

Headache

Nausea, vomiting

Palpable lymphadenopathy

Seizures

Weakness

Weight loss

Tabella II: Sintomi più comuni di neoplasia polmonare suddivisi in base alla causa: tumore primitivo, diffusione intratoracica, diffusione extratoracica. (67)

TUMORE PRIMITIVO

Il sintomo più frequente è la tosse (fino a 75% dei pazienti), in quanto spesso la localizzazione del tumore è a livello delle vie aeree centrali, comportando polmoniti post-ostruttive o aumento di volume dei linfonodi.

Segue la dispnea, la quale si sviluppa nelle fasi iniziali della malattia in una percentuale prossima al 60% dei pazienti ed è dovuta all'occlusione delle vie aeree.

L'emottisi è un'evenienza sicuramente più rara, ma altamente più specifica di neoplasia polmonare.

Infine, è possibile avere nel 50% dei casi un senso di fastidio a livello del torace, descritto come altamente variabile in termini di dolore e localizzazione (67, 68).

DIFFUSIONE INTRATORACICA

La sintomatologia da diffusione intratoracica è presente nel 40% dei casi alla diagnosi di malattia ed è causata dalla estensione della massa primitiva tumorale, o in alternativa all'invasione di stazioni linfonodali limitrofe. Le strutture coinvolte possono essere nervose, vascolari, viscerali e pleuriche. (67, 68)

Le manifestazioni dipendono dalla struttura coinvolta nella crescita della neoplasia. In particolare, spesso si individua un'invasione del nervo laringeo ricorrente, con conseguente disfonia, per i tumori che si sviluppano nel polmone sinistro, in quanto si porta maggiormente in profondità nel mediastino rispetto alla controparte destra.

Un'altra struttura nervosa altamente a rischio di lesione è il nervo frenico, adibito alla regolazione della contrattilità diaframmatica. Si tratta di una problematica rilevabile con una semplice radiografia del torace in cui si nota un sollevamento asimmetrico dell'emidiaframma con innervazione compromessa.

Un'associazione tipica è la presenza di tumore di Pancoast e sindrome di Claude-Bernard-Horner. La neoplasia in questo caso si sviluppa posteriormente a livello dell'apice di un lobo polmonare superiore, causando da un lato dolore e lesioni muscolari, e dall'altro l'invasione del plesso brachiale con coinvolgimento della catena

simpatica e del ganglio stellato. Il danno nervoso di queste strutture si esprime con la sindrome di Horner e la sua triade tipica: enoftalmo, ptosi palpebrale e miosi.

Il cuore e il pericardio possono essere coinvolti in seguito alla diffusione diretta o linfonodale del tumore, portando a tamponamento cardiaco e versamento pericardico in circa il 15% dei pazienti. Molto più frequente, soprattutto nell'istotipo SCLC, è l'ostruzione della vena cava superiore, che comporta un'alterazione del ritorno venoso evidenziabile all'esame obiettivo con edema di volto, collo e palpebre, vene visibilmente dilatate a livello del torace, spalle e braccia. Inoltre, il paziente riporta spesso una sintomatologia di vertigini, cefalea, visione sfuocata e disfagia.

Il coinvolgimento della parete toracica e/o della pleura causa invece algie toraciche (67, 68)

DIFFUSIONE METASTATICA EXTRATORACICA

Le sedi di metastasi più frequenti per la neoplasia polmonare sono le ossa, il fegato, i surreni, i linfonodi intra-addominali, il cervello, il midollo spinale e la cute.

Le metastasi ossee possono comportare un dolore importante e aumentano di molto il rischio di frattura, in particolare a livello delle porzioni prossimali delle ossa lunghe degli arti e dello scheletro assiale.

Le metastasi a livello del fegato, dei surreni e dei linfonodi intra-addominali presentano tipicamente un'obiettività muta, ma possono associarsi a sintomi sistemici aspecifici quali astenia, malessere, calo ponderale.

Nel 10% dei casi si riscontrano metastasi intracraniche, le quali possono comportare la comparsa di cefalea, nausea, vomito, segni neurologici focali, crisi comiziali, confusione e cambiamenti della personalità, mentre il coinvolgimento spinale è più raro e comporta principalmente parestesie, dolore, deficit motori (67, 68).

SINDROMI PARANEOPLASTICHE

Le sindromi paraneoplastiche corrispondono a tutte le sintomatologie causate indirettamente dal tumore, cioè non strettamente correlate all'invasione e compressione dei tessuti limitrofi o a distanza. Attualmente le sindromi paraneoplastiche maggiormente comprese riguardano la secrezione di peptidi e ormoni da parte del tumore, oppure la cross-reattività immunologica tra il tumore e l'ospite, che causano la comparsa di alterazioni dell'omeostasi ormonale del paziente; altre patologie non hanno una fisiopatologia ben identificabile (69).

La diagnosi di queste sindromi si basa sullo studio della funzionalità endocrina, la quale deve subire delle alterazioni riconducibili al tumore secondo alcuni criteri: L'attività endocrina del paziente deve presentare un funzionamento privo del fisiologico meccanismo di feedback; le condizioni del paziente devono peggiorare inspiegabilmente senza l'aumento volumetrico del tumore; la riduzione della neoplasia deve portare ad un miglioramento della funzione endocrina; si devono trovare delle evidenze della presenza di ormoni nel tumore o che la sintesi dell'ormone derivi dallo stesso (70).

Nel caso del tumore al polmone, le sindromi paraneoplastiche si individuano in circa il 10% dei pazienti e principalmente nell'istotipo SCLC. Tra le più frequenti si riscontrano la Sindrome da Inappropriata secrezione di ADH (SIADH), caratterizzata da iponatriemia euvolemica dovuta ad un aumentato riassorbimento d'acqua a livello renale.

Meno frequentemente si evidenziano l'ipercalcemia maligna, associata in genere ad una fase tardiva della malattia e a prognosi sfavorevole, la sindrome di Cushing, sindrome da carcinoide, ipoglicemia, acromegalia, ginecomastia e ipertiroidismo (69, 70).

1.6.2 DIAGNOSI RADIOLOGICA

Una volta appurato il sospetto diagnostico di neoplasia del polmone è necessario approfondire il caso mediante l'utilizzo di tecniche diagnostiche radiologiche (5). L'esame di primo livello è la radiografia del torace, la quale presenta una sensibilità diagnostica tale da individuare lesioni fino a 1 cm di diametro (71). Ha un costo ridotto, basso rischio di problematiche legate alle radiazioni, facilità tecnica di esecuzione (5, 72). I reperti da ricercare con questa indagine possono essere sia direttamente correlati alla neoplasia, come la tipica lesione nodulare singola, che indiretti, come la presenza di aree di ostruzione lobare cronica e collassi polmonari, linfadenopatie ilari, erosioni costali (72).

Se la radiografia risulta sospetta per neoplasia, è necessario approfondire il quadro radiologico mediante l'esecuzione di una TC di torace, addome superiore e regione cervicale inferiore in modo da individuare eventuali interessamenti metastatici a livello di fegato, surreni e linfonodi sovraclaveari (5). La TC è dotata di una risoluzione superiore alla RX, arrivando a mostrare noduli di 1-5 mm di diametro. Inoltre, permette uno studio più approfondito dei linfonodi, che tipicamente vengono ritenuti sospetti nel caso in cui superino i 10 mm di diametro (71, 72). In alcuni casi è consigliato eseguire fin da subito una TC cerebrale per individuare un eventuale coinvolgimento di questa regione, in particolare in Italia si esegue nei pazienti con istologia non squamosa e malattia di stadio II o maggiore evidenziato dagli esami precedenti (5).

Nel caso in cui la TC non evidenzi la presenza di metastasi a distanza, è raccomandato completare la stadiazione con la ¹⁸F-FDG PET-TC (5). Si tratta di un esame che aumenta l'accuratezza diagnostica del coinvolgimento linfonodale rispetto alla TC, ma anche il numero di falsi positivi, per cui è sempre consigliabile applicare successivamente delle tecniche invasive di stadiazione per verificare l'effettiva malignità delle lesioni (5, 73). Un grande limite della PET è legato allo studio dell'encefalo, motivo per cui la TC cerebrale deve sempre essere eseguita in caso di sospetto coinvolgimento a questo livello (73).

La RMN è l'esame elettivo per la valutazione del coinvolgimento metastatico del SNC e viene eseguito generalmente nel caso in cui la TC abbia individuato una o più lesioni sospette, oppure siano presenti sintomi neurologici focali nei pazienti di stadio II-IV di NSCLC candidabili ad un trattamento a scopo curativo (5).

1.6.3 TIPIZZAZIONE DELLA MALATTIA

Esistono numerose tecniche per accedere alla lesione individuata con la diagnostica radiologica ed è fondamentale scegliere quella che equilibri maggiormente il successo diagnostico al tasso di complicanze (74).

I tumori centrali, ovvero visibili endoscopicamente o localizzati nel 1/3 interno del polmone, vengono tipizzati mediante broncoscopia con un rendimento diagnostico pari al 90% (5). Mediante endoscopia è possibile accedere direttamente a lesioni con sviluppo esofitico/infiltrante o mediante agoaspirazione transbronchiale (TBNA – *Trans Bronchial Needle Aspiration*) eventualmente con supporto ecografico in caso di lesioni esterne alla via aerea (EBUS – *EndoBronchial UltraSound* o trans-esofagea EUS – *Endoscopic UltraSound*) (5, 74).

Le lesioni periferiche, localizzate nel 1/3 esterno del polmone e non individuabili endoscopicamente per definizione, sono più complesse e variabili da gestire (5). Vengono utilizzate metodiche percutanee mediante guida TC che presenta il 90% di rendimento diagnostico, nonostante un più elevato rischio di pnx (5, 74).

Le linfadenopatie mediastiniche giudicate sospette alla TC o PET-TC offrono un ottimo equilibrio tra il successo diagnostico (>90%) e il basso tasso di complicanze, in quanto possono essere tipizzate mediante EBUS/EUS (5, 74).

Nei pazienti metastatici la diagnosi può essere eseguita anche nelle sedi secondarie, secondo il criterio del più semplice accesso (ad esempio biopsie percutanee ecoguidate per lesioni linfonodali, sottocutanee o epatiche) (75).

1.6.4 CLASSIFICAZIONE TNM

La stadiazione TNM è uno strumento condiviso per definire l'estensione anatomica della malattia neoplastica tramite la valutazione di tre parametri: fattore T, che indica l'estensione del tumore primario, fattore N che segnala il coinvolgimento linfonodale, fattore M che individua la presenza di eventuali metastasi a distanza. Attualmente l'ultima versione è l'VIII (5).

T (primary tumor)	
T0	No primary tumor
Tis	Carcinoma in situ (squamous or adenocarcinoma)
T1	Tumor ≤3 cm
T1mi	Minimally invasive adenocarcinoma
T1a	Superficial spreading tumor in central airways*
T1a	Tumor ≤1 cm
T1b	Tumor >1 but ≤2 cm
T1c	Tumor >2 but ≤3 cm
T2	Tumor >3 but ≤5 cm or tumor involving: visceral pleura, † main bronchus (not carina), atelectasis to hilum †
T2a	Tumor >3 but ≤4 cm
T2b	Tumor >4 but ≤5 cm
T3	Tumor >5 but ≤7 cm or invading chest wall, pericardium, phrenic nerve; or separate tumor nodule(s) in the same lobe
T4	Tumor >7 cm or tumor invading: mediastinum, diaphragm, heart, great vessels, recurrent laryngeal nerve, carina, trachea, esophagus, spine; or tumor nodule(s) in a different ipsilateral lobe
N (regional lymph nodes)	
N0	No regional node metastasis
N1	Metastasis in ipsilateral pulmonary or hilar nodes
N2	Metastasis in ipsilateral mediastinal or subcarinal nodes
N3	Metastasis in contralateral mediastinal, hilar, or supraclavicular nodes
M (distant metastasis)	
M0	No distant metastasis
M1a	Malignant pleural or pericardial effusion ‡ or pleural or pericardial nodules or separate tumor nodule(s) in a contralateral lobe
M1b	Single extrathoracic metastasis
M1c	Multiple extrathoracic metastases (1 or >1 organ)

Tabella III: Tabella riassuntiva dell'VIII classificazione TNM della neoplasia polmonare (76).

T/M	Subcategory	N0	N1	N2	N3
T1	T1a	IA1	IIB	IIIA	IIIB
	T1b	IA2	IIB	IIIA	IIIB
	T1c	IA3	IIB	IIIA	IIIB
T2	T2a	IB	IIB	IIIA	IIIB
	T2b	IIA	IIB	IIIA	IIIB
T3	T3	IIB	IIIA	IIIB	IIIC
T4	T4	IIIA	IIIA	IIIB	IIIC
M1	M1a	IVA	IVA	IVA	IVA
	M1b	IVA	IVA	IVA	IVA
	M1c	IVB	IVB	IVB	IVB

Tabella IV: Stadiazione prognostica della neoplasia polmonare secondo la classificazione TNM, VIII edizione (76)

L'unione dei tre parametri permette di ottenere una suddivisione della malattia in diversi stadi (tabella IV), i quali hanno una valenza sia prognostica che terapeutica (76).

1.7 TERAPIA DEL NSCLC

1.7.1 TRATTAMENTO DELLO STADIO PRECOCE (I-II)

VALUTAZIONE DEL RISCHIO

Prima di eseguire una terapia locoregionale sul paziente è fondamentale valutare il suo stato di salute e cercare di prevedere come sarà la sua funzionalità dopo aver subito il trattamento locale. Gli interventi chirurgici a livello del polmone inficiano infatti in maniera importante la riserva polmonare e cardiovascolare della persona (65).

Gli algoritmi utilizzati per la valutazione preoperatoria del paziente suggeriscono di effettuare dei test di valutazione per la funzionalità cardiaca e la funzionalità polmonare viene valutata tramite spirometria e il parametro più importante è la FEV1, il cui decremento significativo è un indice di elevato rischio peri-operatorio.

A fronte di una spirometria normale, è importante anche calcolare la DLCO, la quale permette di individuare una riduzione della riserva respiratoria che sarebbe ulteriormente intaccata dalla chirurgia (79).

CHIRURGIA

La chirurgia con intento radicale viene selezionata come trattamento di scelta con intento curativo, ossia di raggiungere la guarigione. Le opzioni chirurgiche sono numerose e devono essere discusse in ambito multidisciplinare al fine di individuare la migliore in termini di rapporto rischio/beneficio. La procedura standard è la lobectomia associata a linfadenectomia ilo-mediastinica, mentre interventi meno radicali come la segmentectomia anatomica sono accettabili unicamente per lesioni non solide a vetro smerigliato o per stadi estremamente precoci (Tis o T1a). Se la localizzazione della lesione non permette di effettuare una lobectomia o è presente un significativo sconfinamento trans-scissurale, è indicata in casi selezionati l'esecuzione di una bilobectomia o pneumonectomia. Qualunque sia la tecnica chirurgica decisa, l'intento deve sempre essere quello della radicalità totale, definita con la sigla R0. Un risultato di R1 (margini microscopicamente positivi per residuo di malattia) o R2 (margini macroscopicamente intaccati da malattia) comporta una prognosi negativa, sovrapponibile ai pazienti non operati. L'analisi dei linfonodi è obbligatoria per completare la stadiazione patologica della neoplasia e comporta l'esecuzione di un'evacuazione chirurgica di almeno 6 stazioni linfonodali. Un'ultima scelta riguarda la tecnica di approccio al torace da utilizzare, tra cui le più utilizzate sono il classico approccio toracotomico o la nuova e microinvasiva videotoracosopia (VATS) (5, 65,80).

Il fattore più importante legato alla buona riuscita dell'intervento è il volume di interventi che vengono eseguiti nel centro di riferimento del paziente. Quindi, la terapia chirurgica è da eseguirsi esclusivamente presso strutture che eseguono almeno 150 interventi di resezione polmonare all'anno e dotate di personale specializzato con molta esperienza (5).

RADIOTERAPIA

La radioterapia stereotattica (SABR) può essere utilizzata come terapia di prima linea in tutti i pazienti inoperabili a causa di comorbidità o rifiuto della procedura, con un controllo locale della malattia del 90% a 5 anni (65).

Il dosaggio delle radiazioni non ha ancora un valore univocamente definito per avere il corretto equilibrio tra resa terapeutica ed effetti collaterali, ma secondo una metanalisi sarebbe opportuno utilizzare dosaggi intermedi (106-146 Gy₁₀) rispetto a dosaggi elevati (>146 Gy₁₀) per garantire una *overall survival* più elevata (81).

Le neoplasie centrali sono definite come masse che si trovano entro 2 cm in tutte le direzioni da strutture mediastiniche critiche (albero bronchiale, esofago, cuore, plesso brachiale, midollo spinale, nervo frenico, nervo laringeo ricorrente).

CHEMIOTERAPIA

La chemioterapia può essere somministrata prima dell'esecuzione della chirurgia, chiamata neoadiuvante, oppure dopo, definita adiuvante.

La chemioterapia adiuvante, invece, viene fortemente consigliata nei pazienti affetti da NSCLC radicalmente operati in stadio II-III con buon *performance status* come opzione terapeutica di prima scelta dalle linee guida. Il trattamento di scelta è una doppietta a base di cisplatino, generalmente associato a vinorelbina o gemcitabina. Il trattamento ha dimostrato un incremento della *overall survival* (OS) a 5 anni di circa 5%, pur essendo associato ad un rischio di morti non-cancro relate (circa 1%) (66).

Nello stadio IA la chemioterapia non è indicata, mentre nello stadio IB può essere presa in considerazione in casi selezionati, con elevato rischio di recidiva, prevalentemente sulla base delle dimensioni della malattia.

ALTRE TERAPIE SISTEMICHE

Attualmente, è indicato il trattamento sistemico post-operatorio con terapia a bersaglio molecolare (osimertinib per 3 anni) in tutte le neoplasie radicalmente operate in stadio IB-IIIa che abbiano o meno ricevuto una chemioterapia adiuvante, sulla base dei risultati dello studio di fase III ADAURA, che ha dimostrato un vantaggio molto importante anche in termini di *OS* rispetto al placebo, a fronte di un buon profilo di tolleranza. (5, 84, 85)

Più recentemente la terapia adiuvante con alectinib per due anni ha dimostrato netta superiorità in termini di sopravvivenza libera da ripresa di malattia (DFS) rispetto alla chemioterapia standard nei pazienti con fusione di ALK.

Il trattamento immunoterapico adiuvante è attualmente indicato dopo il trattamento chemioterapico per i pazienti ad elevata espressione di PD-L1 (5).

1.7.2 TRATTAMENTO DELLA MALATTIA LOCALMENTE AVANZATA (IIIA-IIIC)

La gestione della malattia localmente avanzata è più complessa e si basa sulla gestione multidisciplinare, a partire da una corretta stadiazione (5).

MALATTIA LOCALMENTE AVANZATA RESECABILE

La definizione di malattia resecabile segue dei punti specifici: tumore N2 con solo una stazione positiva, non *bulky*, tumore T4, N0 in cui è considerato possibile eseguire una resezione R0; dopo terapia di induzione, si assiste ad un *down-staging* della malattia con possibilità di evitare l'esecuzione di una pneumonectomia (65).

In questi casi lo standard di trattamento attuale è la chemioterapia preoperatoria seguita da chirurgia ma i risultati degli studi già disponibili dimostrano chiaro beneficio anche in termini di sopravvivenza del trattamento chemio-immunoterapico in assenza di alterazioni sensibilizzanti di EGFR e ALK (5).

MALATTIA LOCALMENTE AVANZATA NON RESECABILE

La neoplasia viene definita non resecabile in tutti i casi in cui non è possibile giungere ad una resezione completa (R0) neppure dopo la somministrazione di una terapia di induzione, ovvero i pazienti allo stadio IIIB, IIIC o IIIA con coinvolgimento N2 multiplo, N3 o T3-T4 che sono troppo estesi localmente (65).

La terapia d'elezione è la chemio-radioterapia con la CT a base di platino unito ad un altro chemioterapico (etoposide, paclitaxel). In particolare, studi prospettici hanno dimostrato la superiorità dell'approccio concomitante rispetto a quello sequenziale, in cui veniva prima somministrata la CT e poi la RT. Quest'ultimo può essere preso in considerazione nei pazienti con comorbidità o performance status tali da non reggere la terapia contemporanea (86).

Dopo il trattamento chemio-radioterapico a dosaggio radicale, è indicata terapia di mantenimento con durvalumab per 12 mesi nei pazienti con espressione di PD-L1 uguale o superiore all'1%, che non abbiano sviluppato progressione dopo il trattamento locale. Lo studio che ha permesso di validare questa opzione terapeutica è il PACIFIC, il quale ha confrontato durvalumab e placebo nei pazienti con malattia localmente avanzata non resecabile. I dati finali dello studio dimostrano un vantaggio importante del gruppo del durvalumab rispetto al placebo, sia in termini di PFS (*Progression Free Survival*), sia di OS (*Overall Survival*) e tassi di recidiva (86).

1.7.3 TRATTAMENTO DELLA MALATTIA AVANZATA

La malattia avanzata viene considerata per i pazienti con uno stadio IIIB/IIIC che non è suscettibile ai trattamenti locoregionali ad intento radicale o uno stadio IV. I parametri su cui si basa la scelta della terapia sono l'istologia del tumore, la presenza di specifiche alterazioni molecolari, il livello di espressione di PD-L1, le caratteristiche cliniche del paziente (età, *performance status*, comorbidità) (8).

1.7.3.1 MALATTIA *ONCOGENE-ADDICTED*

Il concetto di neoplasia *oncogene-addicted* è legato alla capacità del tumore di accumulare delle mutazioni genetiche durante la propria crescita. In alcuni casi, nonostante la complessità del genotipo neoplastico, è possibile individuare degli specifici geni, che danno origine a specifiche proteine singolarmente responsabili per la crescita e la sopravvivenza cellulare. Queste mutazioni sono definite *driver* e, poiché apportano un vantaggio biologico in termini di proliferazione e sopravvivenza, vengono selezionate positivamente durante la maturazione della malattia (87).

Questo concetto fisiopatologico che sta alla base dello sviluppo di alcune neoplasie ha permesso di creare la terapia a bersaglio molecolare, la quale colpisce proprio le mutazioni *driver* che favoriscono la crescita del tumore e permette di cronicizzare e controllare la malattia più efficacemente delle terapie sistemiche convenzionali come la chemioterapia (87).

MUTAZIONE DI EGFR

Esistono più generazioni di inibitori tirosinchinasici di EGFR, in particolare la prima generazione include gefitinib, erlotinib e icotinib, i quali sono inibitori reversibili del dominio ATPasico di EGFR. Molti studi di confronto hanno dimostrato la superiorità di questa generazione di inibitori rispetto allo standard a base di platino (5, 88).

La seconda generazione include afatinib e dacomitinib, il cui scopo iniziale era superare le resistenze ai farmaci di prima generazione.

Tra i farmaci di terza generazione, osimertinib è caratterizzato da elevata attività a livello centrale e capacità di azione nei confronti della mutazione T790M, che rappresenta il più frequente meccanismo di resistenza acquisita agli inibitori di prima e seconda generazione. Il meccanismo d'azione si basa sulla formazione di un legame covalente tra il farmaco e il dominio legante l'ATP di EGFR mutato, mentre EGFR *wild-type* viene inibito irrisoriamente. Osimertinib presenta, infatti, un

profilo di tollerabilità ed efficacia molto superiore alle precedenti generazioni con meno effetti collaterali e una PFS e OS migliori. Rappresenta attualmente lo standard di trattamento in prima linea per le mutazioni classiche. Il motivo di tale scelta è legato allo studio FLAURA, il quale ha confrontato l'efficacia di osimertinib contro quella degli inibitori tirosin-chinasici standard di EGFR. Si è individuata una PFS di 18,9 mesi per i pazienti del gruppo di osimertinib contro i 10,2 mesi dell'altro gruppo. Le progressioni cerebrali di malattia si sono verificate solo in 17 pazienti (6%) contro i 42 (15%) degli altri TKI, dimostrando un'importante penetranza del farmaco anche a livello dell'SNC, che è una sede di metastasi tipica degli adenocarcinomi *oncogene-addicted*. Questi ottimi risultati sull'efficacia sono stati sostenuti anche da una buona tolleranza del farmaco, con effetti avversi sovrapponibili tra i due gruppi tranne che per l'allungamento del QT, il quale ha avuto un'incidenza doppia nel gruppo di osimertinib (5% vs 10%) (5, 90, 91).

Il trattamento attualmente standard a progressione ad osimertinib è rappresentato dalla chemioterapia con platino e pemetrexed ma sono disponibili i risultati di diversi studi che prevedono l'utilizzo di strategie a bersaglio molecolare in particolare sulla base del principale meccanismo di resistenza acquisita, l'amplificazione di MET (92).

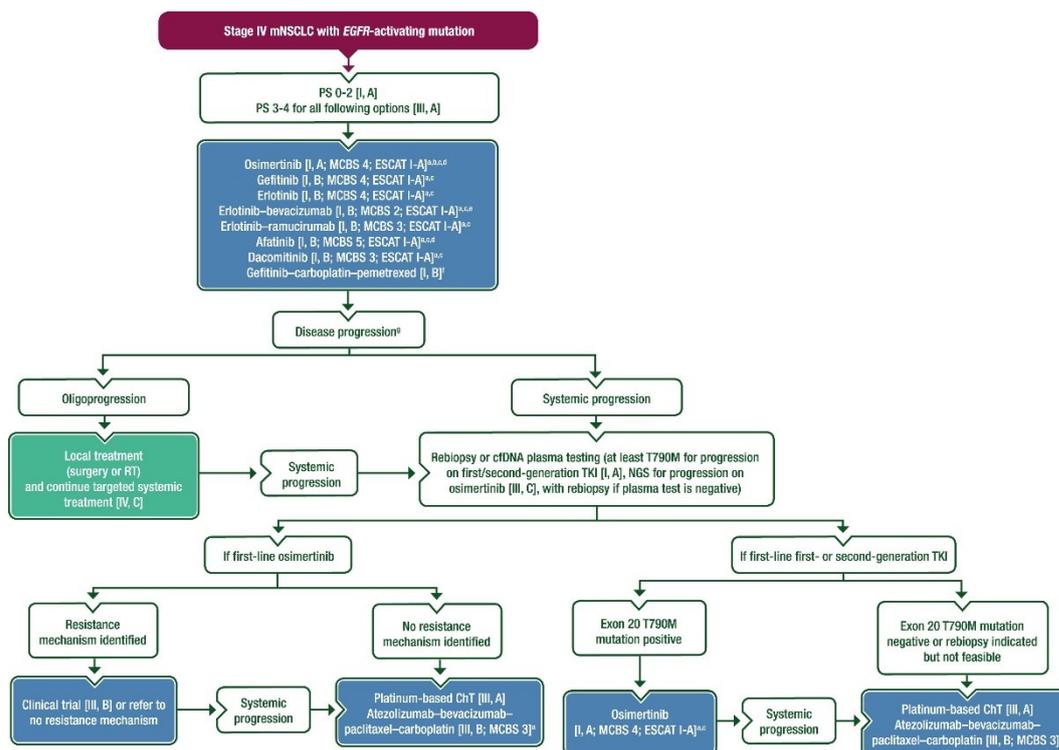


Figura 8: Algoritmo per il trattamento del NSCLC allo stadio IV con mutazioni attivanti di EGFR (91).

TRASLOCAZIONI DI ALK

Crizotinib è il primo farmaco sviluppato per trattare questo tipo di alterazioni e in uno studio di confronto con la chemioterapia standard si è dimostrato molto più efficace con una PFS mediana di 7,7 mesi contro 3 mesi. Dato lo sviluppo di resistenza acquisita al farmaco, sono stati sintetizzati inibitori di seconda generazione, tra cui ceritinib, alectinib e brigatinib, caratterizzati dall'attività in presenza di alcune delle mutazioni note di resistenza a crizotinib e maggiore attività intracranica. Attualmente è disponibile anche lorlatinib, un inibitore competitivo del dominio ATPasico sia di ALK, con spiccata attività intracranica (87). Tutti questi nuovi inibitori sono stati confrontati con crizotinib in prima linea ma non sono disponibili dati di confronto diretto tra i nuovi inibitori (5, 91).

RIARRANGIAMENTI DI ROS1

Crizotinib e entrectinib sono attualmente approvati per l'utilizzo in prima linea, mentre sono in corso diversi studi con nuovi inibitori (5).

ALTRI TARGET MOLECOLARI

Le mutazioni della serina/treonina chinasi BRAF sono presenti nel 5% degli adenocarcinomi polmonari e la più frequente è la V600E. Al contrario di ROS1 e ALK, non c'è una maggiore incidenza nei pazienti non fumatori e giovani. (5) Il trattamento consigliato per le mutazioni della serina/treonina chinasi BRAF e in particolare per la V600E è la combinazione di dabrafenib e trametinib, cioè un inibitore di MEK e di BRAF (87, 91).

Anche l'*exon skipping* di *Met* può essere trattato con farmaci a bersaglio molecolare, tra cui crizotinib, capmatinib, attualmente indicati a progressione dopo chemio-immunoterapia (87, 91).

In presenza di riarrangiamenti di *ret*, sono disponibili trattamenti mirati (selpercatinib e pralsetinib), molto efficaci anche a livello del SNC e con un buon profilo di tollerabilità. Entrambi sono approvati dopo chemio-immunoterapia anche se selpercatinib ha dimostrato di essere superiore alla doppietta a base di platino con o senza immunoterapia in uno studio di confronto di fase III in prima linea (87, 91).

Le fusioni di *Ntrk* stanno acquisendo sempre più interesse, tanto che sono già stati approvati larotrectinib e entrectinib come trattamenti di prima linea nei pazienti che presentano mutazioni di questo gene (5, 91).

Nei pazienti con mutazione G12C di *Kras*, è attualmente indicato il trattamento con sotorasib dopo progressione a chemio-immunoterapia (5, 87).

1.7.3.2 MALATTIA NON *ONCOGENE-ADDICTED*

Nei pazienti con NSCLC metastatico, in assenza di mutazioni *driver*, l'immunoterapia rappresenta il cardine del trattamento sistemico. L'immunoterapia si associa ad un miglioramento della sopravvivenza sia quando somministrata da sola che in associazione alla chemioterapia. Si associa ad un buon profilo di tollerabilità.

Attualmente in Italia, la prima linea di terapia di scelta è rappresentata dalla sola immunoterapia (pembrolizumab, atezolizumab o cemiplimab) in presenza di espressione di PD-L1 >50% (5).

Se l'espressione di PD-L1 è inferiore al 50% in pazienti affetti da NSCLC non oncogene addicted il trattamento standard è l'associazione di chemioterapia (doppietta a base di platino scelta secondo istologia) e immunoterapia (pembrolizumab) (5, 93).

Un'altra combinazione attualmente approvata è l'associazione di soli due cicli di chemioterapia e nivolumab e ipilimumab, seguiti da mantenimento con i due immunoterapici (93).

Nei pazienti che sviluppino progressione dopo mono-immunoterapia il trattamento di scelta, se fattibile, è rappresentata dalla doppietta a base di platino.

Dopo il trattamento chemio-immunoterapico (concomitante o sequenziale, secondo i livelli di PD-L1) il trattamento standard è rappresentato dalla chemioterapia con docetaxel. Nell'istologia non squamosa è possibile l'aggiunta dell'antiangiogenico nintedanib (5, 93).

POPOLAZIONI SPECIALI

Le considerazioni fatte fino a questo momento sui diversi approcci terapeutici del paziente metastatico *non oncogene-addicted* riguardano soggetti con performance status di 0 o 1 e con un'età inferiore ai 70 anni, in quanto nella maggior parte dei trial clinici chi si trova al di fuori di queste categorie viene escluso a priori per evitare di ottenere risultati falsati dalla scarsa *fitness* della popolazione. Tuttavia, i pazienti che alla diagnosi presentano un PS superiore o uguale a 2 sono il 20-30%

del totale, per cui è necessario individuare il miglior approccio terapeutico per questa sottocategoria (94).

Nei pazienti anziani (età >70 anni) con PS di 0 o 1 si è dimostrata la superiorità della monoterapia con agenti di terza generazione rispetto al BSC e successivamente la superiorità delle combinazioni a base di platino rispetto alla monoterapia o alle doppiette senza platino. Tuttavia, l'aumento di efficacia è accompagnato da una maggiore incidenza di effetti avversi che possono compromettere la qualità di vita (5, 93).

Anche per i pazienti con PS uguale a 2 si individua una superiorità della chemioterapia di associazione a base di platino rispetto alla monoterapia, ma in questo caso la tossicità, prevalentemente ematologica, deve essere valutata caso per caso, in quanto c'è molta eterogeneità all'interno di questa categoria di pazienti. In caso di PS uguale a 3 o 4, la BSC è l'unica strada percorribile, in quanto qualsiasi tentativo di terapia non sarebbe sopportato dal fisico di questi soggetti (5, 93, 94).

1.8 BIOPSIA LIQUIDA

La biopsia liquida è un metodo di analisi molecolare che permette di interrogare dei campioni di tessuto liquido. Ci sono vari fluidi che possono essere sfruttati a questo scopo, tra cui i principali sono sicuramente il sangue, le urine, il fluido ascitico, il fluido pleurico e il liquido cerebrospinale. Il vantaggio di questa metodica rispetto alla biopsia tissutale classica è la minore invasività della procedura e la conseguente possibilità di ripeterla più frequentemente senza danni al paziente e con costi contenuti, anche se la sensibilità è certamente minore. La biopsia liquida permette di ricercare *cell-free DNA* (cfDNA), DNA circolante liberamente nel sangue o in altri campioni di fluido. Si individua anche il ctDNA (*circulating tumor DNA*), il quale invece ha una sicura origine neoplastica. Negli ultimi anni si è in grado di intercettare anche esosomi, microRNA, RNA circolante e piastrine (*Tumor-Educated blood Platelets*), i quali hanno un significato ancora dubbio nel contesto clinico. Infine, è possibile trovare anche le cellule tumorali circolanti, cellule che hanno origine dalla massa principale o da una metastasi tumorale e vengono immesse in circolo per un

lasso di tempo breve (1-2 ore), per poi essere distrutte dal sistema immunitario dell'ospite (95, 96).

Nella pratica clinica, viene utilizzata l'analisi quantitativa delle alterazioni genetiche neoplastiche nel sangue al fine di valutare lo stato di EGFR al basale, individuare meccanismi di resistenza ed effettuare analisi NGS per altri *driver*.

Le tecniche usate e le applicazioni in ambito di ricerca sono molto più ampie e prevedono l'analisi sia qualitativa delle alterazioni tumore-relate nel plasma che quantitativa e le loro variazioni dinamiche durante il trattamento (97, 98, 99).

Nei pazienti con *NSCLC* a stadio avanzato o metastatico e genotipo sconosciuto, la *International Association for the Study of Lung Cancer* (IASLC) ha proposto un algoritmo specifico che permette di capire come è meglio sfruttare la biopsia liquida:

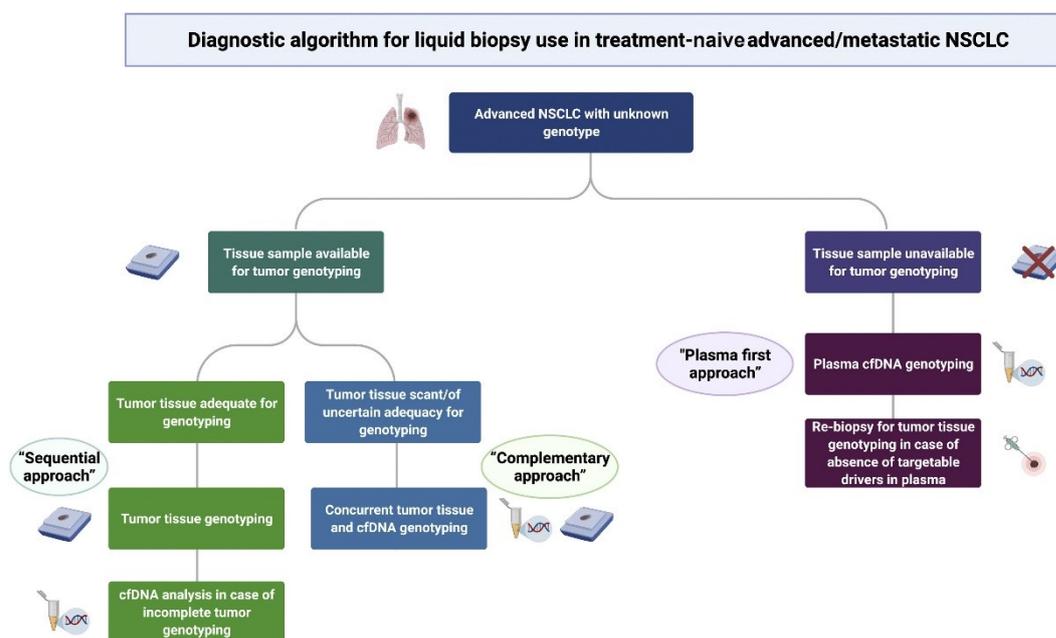


Figura 9: Algoritmo diagnostico per l'uso della biopsia liquida nei pazienti con *NSCLC* in stadio avanzato o metastatico. (97)

I pazienti che non hanno possibilità di andare incontro alla biopsia tissutale seguono il *plasma first approach*, ovvero prima eseguono la biopsia liquida alla ricerca di

mutazioni *driver* a livello del plasma e solo nel caso in cui queste non vengano individuate si passa ad una re-biopsia tissutale. Nel caso in cui sia possibile eseguire una biopsia tissutale fin da subito, ci sono due alternative: *complementary approach*, che consiste nell'effettuare contemporaneamente la biopsia liquida e quella tissutale per supplire ad un'eventuale inadeguatezza del campione raccolto e *sequential approach*, in cui si è sicuri della validità del campione tissutale e quindi si esegue un sequenziamento del campione liquido solo in caso di genotipizzazione incompleta del tumore. (100, 101).

Le applicazioni possibili sono molte, tra cui la valutazione dinamica dei meccanismi di resistenza, la stratificazione prognostica, l'andamento della terapia (99).

2. SCOPO DELLO STUDIO

Il ruolo di osimertinib come trattamento di prima linea nel carcinoma polmonare non a piccole cellule con EGFR mutato è ben definito; tuttavia, non sempre si ottiene un beneficio clinico duraturo e non sono attualmente disponibili marcatori che permettono di predire a priori i pazienti che ne trarranno beneficio nullo o limitato.

La biopsia liquida ha la possibilità di individuare e monitorare lo stato mutazionale di EGFR e di altre alterazioni genetiche correlate al tumore nel plasma durante il trattamento.

Lo scopo dello studio consiste nella valutazione della fattibilità della biopsia liquida al basale e durante il trattamento con osimertinib nella pratica clinica e la valutazione del ruolo della biopsia liquida nel predire la possibilità di beneficio limitato del trattamento con osimertinib, indicata come probabilità di progressione entro i 6 mesi (resistenza primaria) o entro i 9 mesi (*early progression*).

In particolare, si sono analizzati i campioni di plasma dei pazienti al tempo T0 (momento dell'inizio della terapia sistemica), dopo 10 giorni dall'inizio della terapia (T1) e dopo 28 giorni dall'inizio della terapia (T2).

Sul campione di plasma raccolto al basale è stato eseguito un test NGS per valutare presenza e ruolo di alterazioni genetiche presenti in modo concomitante alle mutazioni sensibilizzanti di *Egfr*. La presenza di tali alterazioni è stata descritta e le più frequenti sono state associate al beneficio del trattamento in termini di mancata risposta obiettiva, resistenza primaria o progressione entro 9 mesi dall'inizio del trattamento.

Sui campioni raccolti al T0, T1, T2 è stata anche eseguita determinazione della presenza della mutazione sensibilizzante di *Egfr* e sua quantificazione relativa.

La presenza/assenza della mutazione nel sangue, le sue variazioni relative durante il trattamento sono state associate alla risposta al trattamento ed alla probabilità di mancata risposta obiettiva, probabilità di resistenza primaria o progressione precoce.

3. MATERIALI E METODI

3.1 DISEGNO DELLO STUDIO

Lo studio REM è uno studio clinico multicentrico, prospettico, traslazionale nel quale vengono arruolati pazienti affetti da NSCLC in stadio avanzato con mutazione di *Egfr* e indicazione al trattamento sistemico di prima linea con l'inibitore tirosin-chinasico osimertinib. L'obiettivo principale dello studio consiste nel dimostrare la fattibilità dell'esecuzione sistematica della biopsia liquida al basale e durante il trattamento con osimertinib e nell'esplorare possibili marcatori predittivi di resistenza primaria, definita come sviluppo di progressione di malattia entro i 6 mesi e secondaria. La valutazione dei possibili meccanismi di resistenza acquisita verrà studiata mediante confronto di analisi NGS eseguita su plasma e tessuto al basale e al momento della progressione radiologica di malattia (T3).

Per il presente studio di tesi, vengono analizzati i risultati preliminari dello studio, con focus sui pazienti con resistenza primaria o *early progressors*.

I pazienti sono stati arruolati in modo prospettico da Agosto 2022, con i seguenti criteri di inclusione: diagnosi di NSCLC in stadio avanzato (IIIB non passabile di trattamento radicale o IV), sia come prima diagnosi, sia in caso di recidiva dopo un iniziale trattamento locale; la presenza di una mutazione di EGFR a livello plasmatico o tissutale (comprese le mutazioni rare); l'assenza di trattamenti sistemici precedenti (osimertinib deve essere il farmaco di prima linea per la malattia in stadio avanzato); la presenza di pianificazione della terapia sistemica di prima linea e la possibilità di seguire il paziente in follow-up clinico e radiologico ad intervalli di tempo adeguati. Il trattamento somministrato ai pazienti è osimertinib e le valutazioni radiologiche, sia al basale che successivamente, hanno impiegato come strumentazione la TC con mezzo di contrasto iodato secondo lo stato dell'arte della pratica clinica. La partecipazione allo studio non ha in nessun modo influenzato le scelte terapeutiche nei percorsi diagnostici, che sono tutti attuati secondo pratica clinica.

I dati raccolti al basale includono i dati demografici del paziente, l'ECOG PS, la storia di fumo e la stadiazione radiologica.

Il comitato etico dell'Istituto Oncologico Veneto (IOV) ha valutato e approvato il design dello studio e il consenso informato. Allo stesso modo, altri comitati etici locali hanno analizzato e concesso il via libera per l'attuazione dello studio. Il consenso informato scritto è stato raccolto per tutti i pazienti prima di essere ufficialmente inseriti nel database dello studio. Lo studio risulta in linea con la Dichiarazione di Helsinki.

I campioni di plasma sono stati prelevati prima dell'inizio del trattamento (T0), dopo 10 giorni (T1), dopo 28 giorni (T2) e al momento della progressione clinica o radiologica della malattia (T3). Al tempo T0 e T3 l'analisi genetica si è avvalsa della *Next-Generation Sequencing* (NGS) con un pannello di 77 geni "Avenio". L'analisi delle mutazioni plasmatiche di EGFR ha sfruttato la RT-PCR per tutti i tempi dello studio.

3.2 RACCOLTA E PROCESSAZIONE DEI CAMPIONI

La quantità di sangue prelevata ad ogni punto temporale è di 20 mL all'interno di tubi di tipo *Streck*, i quali presentano una tecnologia innovativa in grado di mantenere stabili sia le CTCs sia il cfDNA, permettendo un'analisi attendibile dei campioni anche a distanza di giorni e con risultati soddisfacenti, ed è stata processata entro 24-72 ore. Al T1 sono raccolti 10 mL ulteriori di sangue. Successivamente il sangue veniva centrifugato a 2000g per 10 minuti a 4°C per isolare il plasma. Il plasma così raccolto veniva sottoposto ad un'ulteriore centrifugazione a 20000g per altri 10 minuti e conservato in strutture refrigeranti a -80°C.

3.3 ANALISI NGS

Il cfDNA veniva poi estratto da 5 mL di plasma tramite il Kit di Isolamento AVE-NIO per il cfDNA (*Roche Diagnostics*), diluito all'interno di 60 µL di soluzione tampone, e infine mantenuto stabile alla temperatura di -20°C. Secondo le istruzioni

del Kit di Espansione del cfDNA AVENIO (*Roche Diagnostics*), sono necessari dai 10 ai 50 ng di DNA per ottenere delle biblioteche genetiche attendibili. Il sequenziamento dei campioni è stato svolto mediante la piattaforma Illumina, sfruttando *hg38* come genoma di riferimento. La denominazione delle varianti geniche è basata sul Software di Analisi dei Dati AVENIO. Il pannello genico è composto di 77 geni ed è in grado di individuare SNV (polimorfismi a singolo nucleotide), CNV (variazione del numero di copie), INDEL (inserzioni e delezioni) e fusioni tra geni.

3.4 ANALISI DI REAL-TIME PCR

Il cfDNA è stato estratto da 2 mL di plasma mediante il Kit di Preparazione dei Campioni per il cfDNA della Cobas® (*Roche Diagnostics*), seguendo le istruzioni della casa produttrice. Le analisi molecolari e le relative stime semi-quantitative (SQI) delle mutazioni di EGFR sono state effettuate secondo gli standard della pratica di laboratorio, tramite il Test per le Mutazioni di EGFR v2 CE IVD della Cobas®, che viene utilizzato nel nostro laboratorio.

3.5 ANALISI STATISTICHE

L'obiettivo primario dello studio è descrivere l'attuabilità dell'utilizzo routinario della biopsia liquida nel monitoraggio di pazienti affetti da NSCLC con EGFR mutato. A questo fine, sono stati descritti:

- la compliance alle procedure del trattamento, in termini di campioni raccolti prospetticamente secondo le tempistiche stabilite
- il numero di campioni raccolti che sono risultati "valutabili" per le analisi molecolari pianificate (tra quelli ad oggi analizzati)
- la concordanza tra presenza di mutazione nel plasma e nel tessuto (analizzato con metodica standard, da pratica clinica mediante RT-PCR).

Obiettivi secondari sono:

- descrivere associazione tra mancata clearance al T1 e T2 e probabilità di Resistenza primaria e progressione precoce
- descrivere associazione tra presenza di co-mutazione di TP53 e probabilità di Resistenza primaria e progressione precoce.

Obiettivi esploratori sono:

- stimare il valore predittivo della *clearance* di EGFR al T1 e T2 durante il trattamento con osimertinib in termini di PFS, OS, tasso di risposta radiologica (RR).
- descrivere le co-mutazioni al T0 e valutarne il valore predittivo e prognostico in termini di ORR, PFS, RR
- Descrivere il profilo di efficacia e sicurezza di osimertinib come trattamento di prima linea in un contesto *real-world*. A questo fine, si sono analizzati degli *end-point* di efficacia (ORR, PFS, OS) e di sicurezza (percentuali, tipo e grado degli effetti avversi sulla base della CTCAE – *Common Terminology Criteria for Adverse Events* v5.0).

Il target minimo di pazienti da arruolare allo studio nei centri aderenti entro 24 mesi è di 100 soggetti affetti da NSCLC avanzato. Questa numerosità campionaria è necessaria per stimare la presenza di nuove mutazioni genetiche al momento della progressione di malattia. Il calcolo della numerosità campionaria si basa sulle diagnosi di neoplasia polmonare EGFR mutata registrate nel 2020, e sul fatto che il trial clinico FLAURA abbia evidenziato come le alterazioni genetiche più frequenti fossero individuate nel 15% dei pazienti. Secondo questa incidenza, il numero di pazienti previsto con una nuova alterazione genetica in un bacino di soggetti di 100 unità sarà di 15.

Per il presente lavoro di tesi, sono stati considerati i risultati preliminari, sui pazienti effettivamente analizzati e sono stati valutate in primis le associazioni tra le variabili molecolari con la probabilità di resistenza primaria o progressione precoce.

La resistenza primaria a osimertinib viene definita come la progressione di malattia entro 6 mesi dall'inizio della terapia (88) mentre per le analisi di tesi abbiamo definito come *early progression* la progressione di malattia che avviene entro 9 mesi

dall'inizio del trattamento, che corrisponde alla metà della mediana di PFS nello studio clinico FLAURA che ha portato all'approvazione di osimertinib in prima linea (90).

Il riassunto descrittivo delle variabili continue include il numero di osservazioni (n), la media, la deviazione standard, la mediana, il minimo e il massimo, il 25° e 75° percentile. Mentre il riassunto descrittivo delle variabili categoriche include il conteggio (n) e le percentuali. I dati non valutabili o mancanti sono stati trattati secondo la strategia definita a priori nel piano di analisi statistica. Il riassunto descrittivo per il parametro *time-to-event* include la mediana e il suo intervallo di confidenza del 95% usando il metodo di Kaplan-Meier.

Il tasso di risposta, definito RR è stato calcolato usando i criteri RECIST v 1.1 (103). Si sono individuate tre categorie di beneficio clinico crescente: malattia stabile definita come malattia stabile (*Stable Disease, SD*), risposta parziale (*Partial Response, PR*), risposta completa (*Complete Response, CR*). La proporzione di pazienti in controllo di malattia (*Disease Control Rate, DCR*) include pazienti stabili ed in risposta radiologica parziale o completa. La PFS è stata calcolata partendo dal momento in cui si è incominciato il trattamento sistemico con osimertinib (corrispondente al T0 precedentemente descritto) fino alla progressione radiologica di malattia o alla morte per qualunque causa. I pazienti che non hanno ancora presentato un evento di progressione durante lo svolgimento dello studio sono stati censurati alla data dell'ultima osservazione clinica. La PFS e OS (tempo al quale si verifica la morte indipendentemente dalla causa) mediane sono state stimate tramite il metodo di Kaplan-Meier

I risultati dei test condotti mediante biopsia liquida sono stati valutati sia da un punto di vista statico (presenza vs assenza di alterazioni genetiche), sia utilizzando dei parametri dinamici.

L'analisi dei risultati della NGS è stata descritta seguendo le indicazioni del relativo software di analisi e filtrati secondo i seguenti criteri: i polimorfismi e le mutazioni germinali sono stati esclusi, le restanti alterazioni sono state valutate in base alla loro rilevanza patogenica secondo i database di Varsome e Franklin. Dopo questa

ulteriore scrematura, sono state escluse le VUS (*Variant of Uncertain Significance*) e le mutazioni benigne.

L'attendibilità delle analisi su plasma con NGS è stata valutata mediante il calcolo percentuale dei campioni valutabili al basale su tutti i campioni raccolti nello studio e stimando la concordanza tra i risultati su plasma e su tessuto al basale.

Le alterazioni genetiche trovate nel plasma al basale sono state registrate e associate quantitativamente agli *end-points* prognostici in termini di *OS*, *PFS* e *ORR*.

La RT-PCR è stata impiegata per la quantificazione relativa delle mutazioni di *Egfr* ai tempi T0, T1 e T2 e la presenza della mutazione di *Egfr* ad ogni punto temporale dello studio è stata associata alla prognosi dei pazienti mediante l'utilizzo dei parametri di *OS*, *PFS* e *RR*. Inoltre, si è valutata l'associazione tra la presenza della mutazione di *Egfr* e il carico di malattia dei soggetti, in termini di numero di siti di metastasi interessati alla diagnosi.

La *clearance* è definita come il raggiungimento di una quantità nulla di DNA circolante rilevabile mediante biopsia liquida.

Ad intento esploratorio, si sono osservate anche le variazioni quantitative della mutazione ritrovata nel plasma, facendo riferimento al parametro definito indice semi-quantitativo (SQI) delle mutazioni di EGFR al T1 e T2. Tale parametro rappresenta una quantificazione della presenza relativa della mutazione e deriva dall'analisi mediante RT-PCR. È quindi una misura indiretta della frequenza allelica dell'alterazione genica (*Variant Allele Frequency*, VAF) e misura la proporzione delle varianti alleliche di un locus all'interno del cfDNA.

Un aumento di SQI (T1-T0 e T2-T0) è stato associato con il rischio di *PD* e morte.

La descrizione dell'efficacia e sicurezza di osimertinib in un contesto *real-world* si è avvalsa dei seguenti indicatori: *OS* mediana, *PFS* e *RR*; percentuale di risposta a livello dell'SNC (Sistema Nervoso Centrale) e percentuale di progressione nel SNC; percentuale, tipo e grado degli effetti avversi della terapia secondo la CTCAE v5.0.

4. RISULTATI

4.1 CARATTERISTICHE DELLA POPOLAZIONE IN STUDIO

4.1.1 CARATTERISTICHE CLINICHE

I pazienti che sono stati arruolati per lo studio da agosto 2022 sono 106, provenienti da 4 centri differenti: 82 (77%) dall'Oncologia 2 dell'Istituto Oncologico Veneto, 9 (8%) dall'Oncologia Medica dell'Ospedale di San Bortolo di Vicenza – ULSS 8, 8 (7%) dall'Oncologia ed Ematologia dell'Ospedale di Mirano – ULSS 3, 6 (6%) dall'Oncologia dell'Ospedale di San Bassiano di Bassano – ULSS 7 e 1 (1%) dall'Oncologia Medica dell'Ospedale dell'Angelo di Mestre e dell'Ospedale SS Giovanni e Paolo di Venezia – ULSS3.

Dal punto di vista delle caratteristiche cliniche dei pazienti in carico presso lo IOV sono stati arruolate 59 femmine (60%) e 40 maschi (40%). La mediana d'età al momento della diagnosi di malattia avanzata è di 70 anni (intervallo interquartile 61,76). Dal punto di vista clinico, 83 pazienti (87%) avevano un ECOG *Performance Status* (PS) compreso tra 0 e 1, mentre 12 soggetti (13%) presentavano un valore >1 alla diagnosi. I fumatori attivi erano 7 (8,5%), gli ex fumatori 34 (41%) e coloro che non hanno mai fumato 41 (49,5%). Per quanto riguarda l'istologia, la maggior parte dei pazienti è stata diagnosticata con un adenocarcinoma (n=90; 95%), solamente 2 (2,1%) hanno avuto una diagnosi di carcinoma a cellule squamose e 3 pazienti (3,2%) altri istotipi.

La determinazione dello status mutazionale di EGFR è avvenuta mediante analisi su tessuto in 80 (84%) pazienti, mentre per 12 pazienti (13%) mediante utilizzo esclusivo della biopsia liquida.

Dal punto di vista della tipologia di mutazione le due più comuni sono risultate essere le mutazioni attivanti classiche ovvero le delezioni dell'esone 19, Ex19del (n=47; 49%) e la mutazione puntiforme dell'esone 21, L858R (n=35; 37%). In 7 pazienti (7,4%) è stata riscontrata una mutazione atipica di EGFR e in 6 soggetti

(6,3%) sono state individuate mutazioni composite associate. Al momento della diagnosi, la maggior parte dei pazienti presentava uno stadio IV di malattia (n=90, 95%) e solamente 5 soggetti (5,3%) risultavano in stadio IIIB non eleggibile per trattamento loco-regionale. Tra i soggetti in stadio IV di malattia, 73 (77%) presentavano meno di due sedi di metastasi, mentre 22 (23%) avevano tre o più localizzazioni a distanza. I siti metastatici di maggiore interesse sono il SNC, in cui 18 pazienti (19%) presentavano una localizzazione di malattia e 77 (81%) no; il fegato, in cui 13 soggetti (14%) avevano malattia e 82 (86%) erano esenti; l'apparato scheletrico, le cui percentuali di metastatizzazione sono risultate più elevate con ben 44 soggetti (46%) positivi e 51 (54%) negativi. Tutti i dati clinici della popolazione sono riassunti nella tabella V.

Caratteristiche della popolazione		N = 102
Età mediana al momento della diagnosi		
Anni (IQR)		70 (61, 76)
Fumatori		
Attuali		7 (8,5 %)
Ex		34 (41%)
Non fumatori		41 (49,5%)
Genere		
Maschio		40 (40%)
Femmina		59 (60%)
ECOG PS all'inizio di Osimertinib		
0-1		83 (87%)
>1		12 (13%)
Istologia		
Adenocarcinoma		90 (95%)
Carcinoma a cellule squamose		2 (3,2%)
Altri istotipi		3 (2,1%)
Mutazione di EGFR		
Ex19del		47 (49%)
L858R		35 (37%)
Atipica		7 (7,4%)
Composita		6 (6,3%)
Tipo di biopsia		
Tissutale		80 (84%)
Liquida		12 (13%)
Entrambe		3 (3,2%)
Stadio		
IV		90 (95%)
IIIB		5 (5,3%)
Numero di siti metastatici		
<3		73 (77%)
≥3		22 (23%)
Metastasi cerebrali		
Assenti		77 (81%)
Presenti		18 (19%)
Metastasi epatiche		
Assenti		82 (86%)
Presenti		13 (14%)
Metastasi ossee		
Assenti		51 (54%)
Presenti		44 (46%)

Tabella V: riassunto delle caratteristiche cliniche della popolazione in studio.

4.2 DATI SUL TRATTAMENTO

4.2.1 EFFICACIA DEL TRATTAMENTO

Al momento dell'analisi statistica per il lavoro di tesi, la mediana del follow-up della popolazione in studio è di 8,45 mesi (95% CI 9,13). Le mediane di OS e PFS non sono ancora state raggiunte.

È stato possibile valutare la miglior risposta radiologica in seguito al trattamento con osimertinib in 72 pazienti: 47 soggetti (65%) hanno ottenuto una risposta parziale, 21 (29%) presentano stabilità di malattia e tre (4,2%) non hanno risposto al farmaco e sono andati incontro a progressione molto precoce. Infine, un soggetto (1,4%) ha ottenuto una risposta completa. (tabella VI)

Variabile	N=72 (%)
Miglior risposta al trattamento	
Risposta parziale	47 (65%)
Malattia stabile	21 (29%)
Progressione di malattia	3 (4,2%)
Risposta completa	1 (1,4%)

Tabella VI: dati sulla miglior risposta al trattamento con osimertinib della popolazione dello IOV.

Variabile	N (%), (95% CI)
Follow-up mediano (mesi)	8,45 (9.0, 13)
Objective response rate	48 (67%), (54%, 77%)
Disease control rate	69 (96%), (87%, 99%)
Progressione di malattia	15 (16%), (9.4%, 25%)
Decessi	11 (12%), (6.3%, 20%)

Tabella VII: follow-up mediano e misure di efficacia del trattamento con osimertinib della popolazione dello IOV.

In base a questi dati è possibile ricavare un RR del 67% (95% CI 54%, 77%) e un DCR del 96% (95% IC 87%, 99%).

Al momento dell'analisi, la progressione di malattia è avvenuta in 15 pazienti (16%, 95% IC 9,4%, 25%) e vi sono stati 11 decessi (12%, 95% IC, 6,3%, 20%) (Tabella VII). Solo 4 progressioni su 15 (26%) presentano la mutazione comune Ex19del, e la maggior parte presenta la L858R (6, 40%), mentre i restanti 5 pazienti in progressioni hanno mutazioni rare.

4.2.2 TOSSICITA' DEL TRATTAMENTO

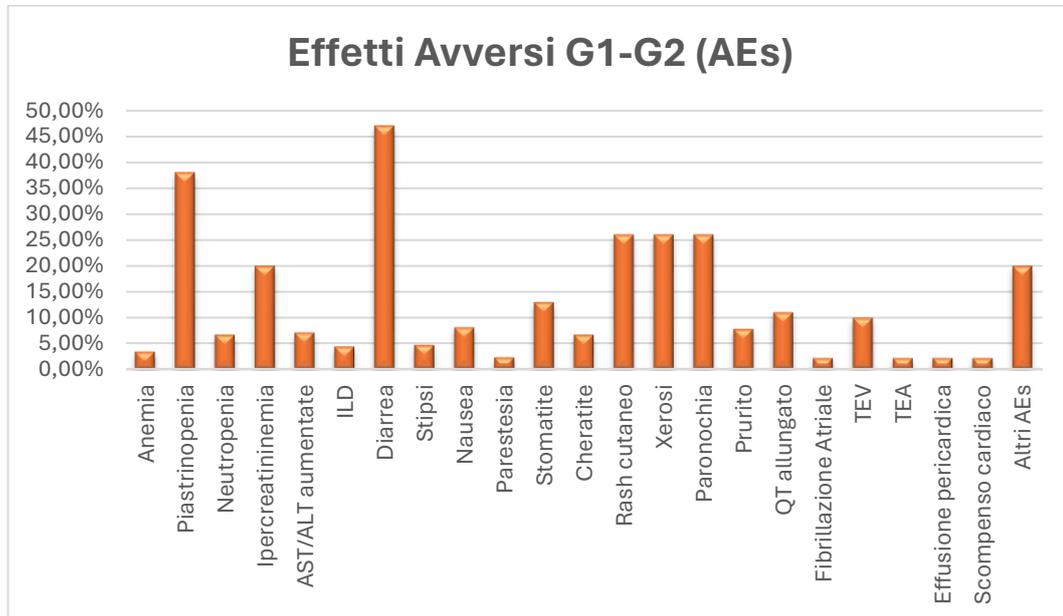


Figura 10: Principali tossicità del trattamento con osimertinib di grado G1-G2.

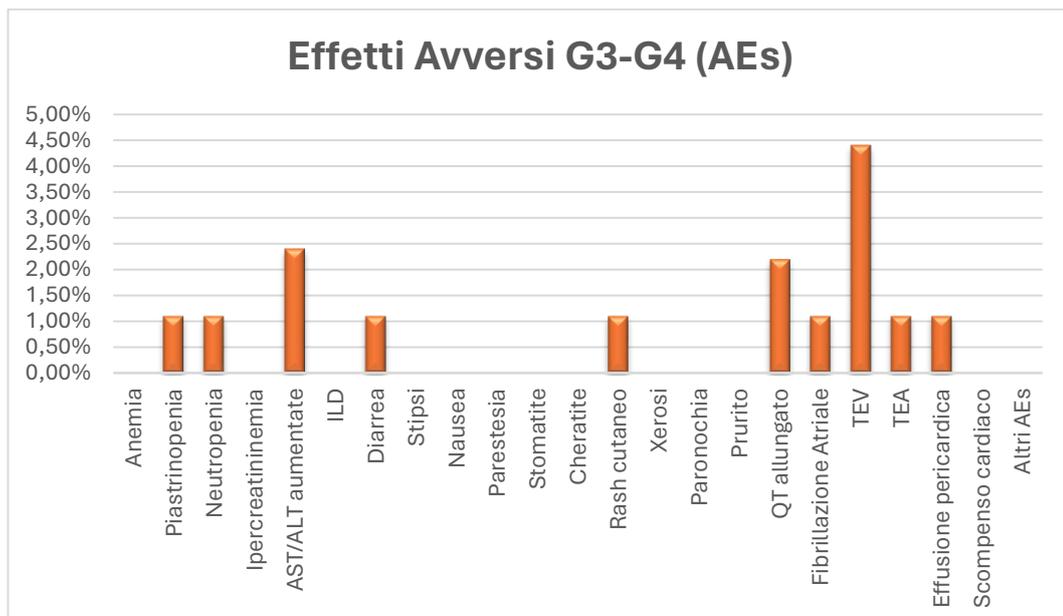


Figura 11: Principali tossicità della terapia con osimertinib di grado G3-G4.

Le figure 10 e 11 riassumono i principali eventi avversi verificatisi durante il follow-up della popolazione in studio. 48 (91%) sono andati incontro ad almeno una tossicità di grado G1-G2. Si nota come i principali *AEs* di basso grado siano la diarrea (47%), la piastrinopenia (38%) e le tossicità cutanee come rash (26%), xerosi (26%) e cheratite (26%); problematiche facilmente gestibili in autonomia dal paziente e che non arrecano cali eccessivi della qualità di vita.

Gli effetti avversi di grado G3-G4 sono molto più rari, in quanto si sono verificati in soli 15 (8,3%) pazienti. In questo caso le problematiche più frequenti riguardano il versante vascolare, in particolare si sono osservati quattro episodi di tromboembolia polmonare (4,4%) e uno di trombosi arteriosa (1,1%).

Il trattamento è stato sospeso temporaneamente in 14 (13,7%) pazienti e permanentemente in tre (2,9%) pazienti di cui due hanno presentato una patologia interstiziale polmonare e uno un *rash* cutaneo severo (G4) tali da determinare l'impossibilità di riprendere il farmaco.

4.3 DATI SULLA BIOPSIA LIQUIDA

4.3.1 MONITORAGGIO PROSPETTICO PLASMATICO

Dei 106 pazienti arruolati ad oggi, 91 (86%) hanno svolto tutti i prelievi programmati da T0 a T2 e 22 (21%) ne hanno saltato almeno uno. In particolare, dei prelievi pianificati, 103 (97%) hanno svolto il prelievo per T0, 98 (92%) per il T1 e 95 (89%) per il T2. Delle 26 progressioni registrate, sono stati svolti 17 (65%) prelievi per il T3. Dei pazienti in progressione, 12 hanno sperimentato la comparsa di sintomi legati alla malattia prima del controllo radiologico programmato, mentre gli altri 14 erano asintomatici e hanno scoperto la progressione della neoplasia tramite TC.

I campioni prelevati per NGS sono 103, di cui ne sono stati analizzati solo 49 (47%) al momento della stesura della tesi. 84 (82%) sono stati analizzati mediante RT-PCR. Dei casi disponibili con NGS è stata riscontrata la mutazione in 41 (84%) casi, mentre in quelli analizzati con RT-PCR la mutazione è stata trovata in 69 (82%) pazienti.

Variabile	N (%)
Popolazione totale	106
Tutti i prelievi da T0 a T2	91 (86%)
Prelievo T0	103 (97%)
Prelievo T1	98 (92%)
Prelievo T2	95 (89%)
Progressioni	26
Prelievo T3	17 (65%)
Prelievi per NGS	103
Analizzati con NGS	49 (47%)
Mutazione EGFR riscontrata	41 (84%)
Prelievi per PCR	103
Analizzati con PCR	84 (82%)
Mutazione EGFR riscontrata	69 (82%)

Tabella VIII: compliance dei pazienti nell'eseguire i prelievi per la biopsia liquida e affinità con la biopsia tissutale.

Dei pazienti arruolati, al momento dell'analisi, i dati di RT-PCR sono disponibili al T0 per 84 (82%) pazienti, al T1 per 72 (70,5%) pazienti, al T2 per 66 (64,7%) pazienti ed al T3 per 15 (14,7%) pazienti.

Dei casi analizzati sino ad oggi, solo due campioni sono risultati non valutabili (non inclusi nell'analisi), si tratta di campioni provenienti da centri esterni allo IOV che per problematiche pratiche sono stati analizzati più di 5 giorni dopo l'esecuzione del prelievo.

Variabile	
SQI (approssimazione cfDNA)	Media (sd)
T0 SQI	8.63 (6.63)
T1 SQI	4.20 (4.84)
T2 SQI	1.73 (3.34)
Clearance del cfDNA	N (%)
T1 Clearance	40 (53%)
T2 Clearance	53 (76%)

Tabella IX: SQI e clearance del cfDNA ai diversi timepoints (T0, T1, T2).

La SQI è una valutazione semiquantitativa del cfDNA del paziente derivata dai risultati della RT-PCR su plasma. Si nota una tendenza evidente di riduzione della concentrazione plasmatica del DNA tumorale, che passa da una media di 8.63 al T0 a 4.20 al T1 e addirittura 1.73 al T2.

La Clearance del cfDNA si raggiunge quando la quantità di DNA tumorale circolante arriva a zero, dunque quando SQI=0. Anche per questo parametro il trend è molto positivo, in quanto già al T1 si hanno 40 (53%) pazienti con mutazione non evidenziabile con RT-PCR e al T2 il numero aumenta a 53 (76%).

4.3.2 CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE BASALE IN NGS

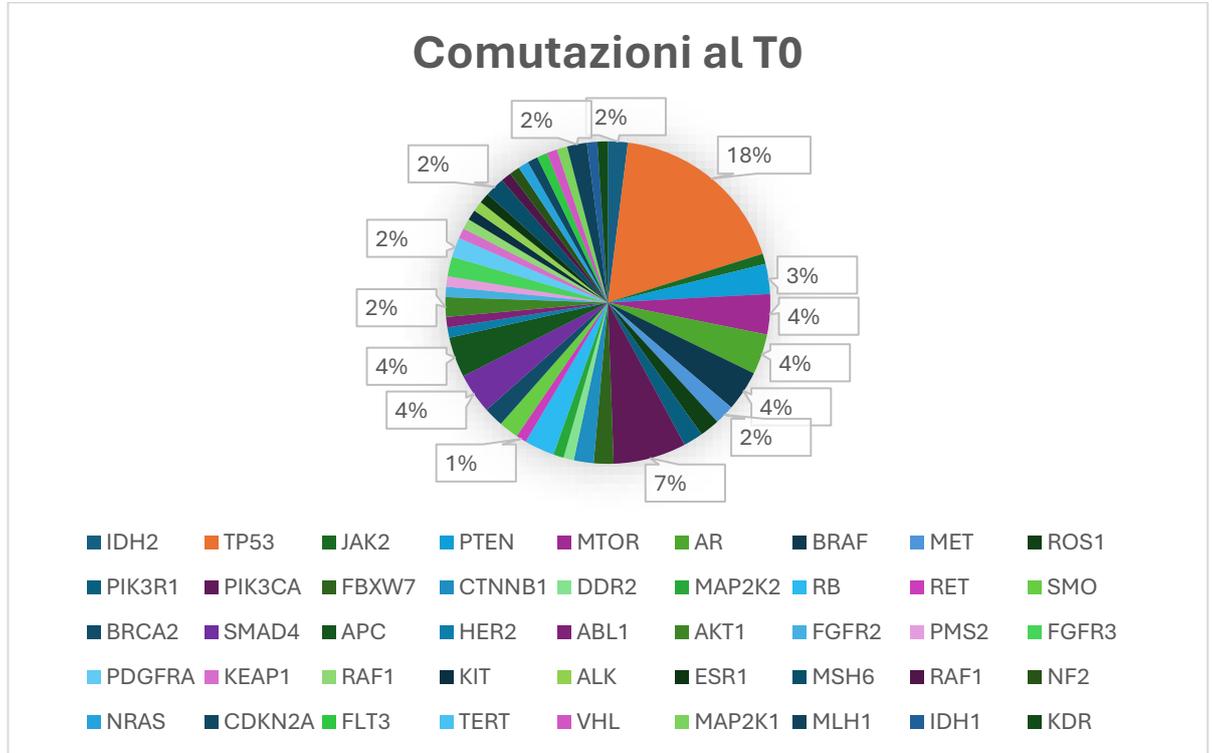


Figura 12: Distribuzione delle co-mutazioni al T0 (analisi effettuata con NGS).

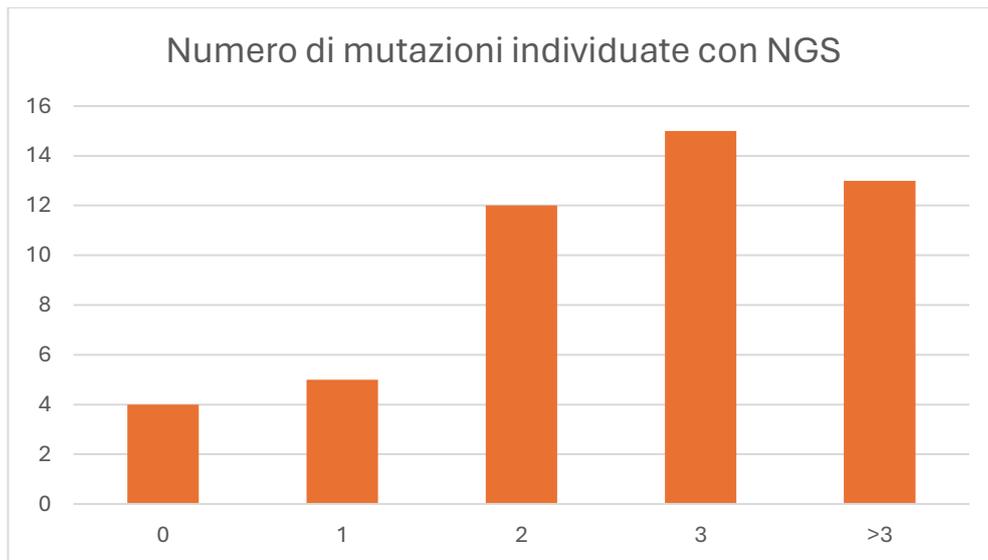


Figura 13: Numero di pazienti con 0, 1, 2, 3 o più mutazioni individuate con NGS

Il grafico a torta (figura 12) illustra i risultati delle analisi molecolari effettuate con NGS al tempo T0. Al momento delle analisi eseguite per la tesi di laurea, sono stati valutati 49 campioni, di cui 41 sono risultati positivi per la mutazione di EGFR, mentre 8 (R004, R008, R014, R016, R021, R026, R050, R061) sono risultati negativi.

Nel complesso sono state riscontrate co-mutazioni a carico di 49 oncogeni differenti, di cui la più frequente è a carico di TP53 (N=19, 18%), a seguire PIK3CA (N=7) con il 7% e poi a seguire tutte le altre.

Il dato sulle mutazioni pro-paziente indica che la maggior parte dei soggetti presenta 2 o più mutazioni (81%), di cui qualcuno addirittura più di cinque contemporaneamente (R022, R031).

4.4 FATTORI PREDITTIVI PER PROGRESSIONE PRECOCE

4.4.1 FATTORI CLINICI

Caratteristiche della popolazione	Non PD, N=48	PD, N=11	P value
Età mediana al momento della diagnosi	71 (66, 77)	66 (58, 69)	0,019
Genere			0,081
Maschio	15 (31%)	7 (64%)	
Femmina	33 (69%)	4 (36%)	
Stato del fumo			0,040
Mai fumatore	31 (65%)	5 (45%)	
Ex fumatore	17 (35%)	4 (36%)	
Fumatore attivo	0 (0%)	2 (18%)	
ECOG PS all'inizio di Osimerti-nib			>0,9
0-1	42 (88%)	10 (91%)	
>1	6 (13%)	1 (9,1%)	
Istologia			>0,9
Adenocarcinoma	46 (96%)	11 (100%)	
Carcinoma a cellule squamose	2 (4,2%)	0 (0%)	
Altri istotipi	0 (0%)	0 (0%)	
Mutazione di EGFR			0,003
Ex19del	27 (56%)	2 (18%)	
L858R	18 (38%)	4 (36%)	
Atipica	3 (6,3%)	3 (27%)	
Composita	0 (0%)	2 (18%)	
Stadio			>0,9
IV	45 (94%)	11 (100%)	
IIIB	3 (6,3%)	0 (0%)	
Numero di siti metastatici			0,7
<3	39 (81%)	8 (73%)	
≥3	9 (19%)	3 (27%)	
Metastasi cerebrali			0,3
Assenti	40 (83%)	11 (100%)	
Presenti	8 (17%)	0 (0%)	
Metastasi epatiche			0,072
Assenti	45 (94%)	8 (73%)	
Presenti	8 (17%)	0 (0%)	
Metastasi ossee			0,6
Assenti	26 (54%)	5 (45%)	
Presenti	22 (46%)	6 (55%)	

Tabella X: relazione tra le caratteristiche cliniche dei pazienti dello IOV e resistenza primaria a 6 mesi.

Caratteristiche della popolazione	Non PD, N=36	PD, N=11	P value
Età mediana al momento della diagnosi	70 (64, 77)	66 (58, 69)	0,046
Genere			0,029
Maschio	9 (25%)	7 (64%)	
Femmina	27 (75%)	4 (36%)	
Stato del fumo			0,048
Mai fumatore	27 (75%)	5 (45%)	
Ex fumaotre	9 (25%)	4 (36%)	
Fumatore attivo	0 (0%)	2 (18%)	
ECOG PS all'inizio di Osimerti-nib			>0,9
0-1	31 (86%)	10 (91%)	
>1	5 (14%)	1 (9,1%)	
Istologia			>0,9
Adenocarcinoma	34(94%)	11 (100%)	
Carcinoma a cellule squamose	2 (5,6%)	0 (0%)	
Altri istotipi	0 (0%)	0 (0%)	
Mutazione di EGFR			0,006
Ex19del	21 (58%)	2 (18%)	
L858R	13 (36%)	4 (36%)	
Atipica	2 (5,6%)	3 (27%)	
Composita	0 (0%)	2 (18%)	
Stadio			>0,9
IV	34 (94%)	11 (100%)	
IIIB	2 (5,6%)	0 (0%)	
Numero di siti metastatici			0,7
<3	28 (78%)	8 (73%)	
≥3	8 (22%)	3 (27%)	
Metastasi cerebrali			0,2
Assenti	29 (81%)	11 (100%)	
Presenti	7 (19%)	0 (0%)	
Metastasi epatiche			0,076
Assenti	34 (94%)	8 (73%)	
Presenti	2 (5,6%)	3 (27%)	
Metastasi ossee			0,6
Assenti	20 (56%)	5 (45%)	
Presenti	16 (44%)	6 (55%)	

Tabella XI: relazione tra le caratteristiche cliniche dei pazienti dello IOV e ePD (early Progression Disease) a 9 mesi.

Un punto importante dello studio è cercare dei fattori prognostici che possano predire l'andamento della malattia e del trattamento.

La probabilità di progressione entro 6 mesi (resistenza primaria) è incrementata nei pazienti con età più giovane ($p=0,019$) e con storia di fumo ($p=0,040$), mentre altri fattori come l'ECOG, lo stadio alla diagnosi, il numero e il tipo di metastasi non sembrano correlare con andamenti clinici differenti. Tutti i pazienti fumatori attivi hanno avuto PD come miglior risposta radiologica. Molto evidente è stato anche l'impatti del tipo di mutazione individuata, in quanto quelle più frequenti (ex19del e L858R) hanno un minor rischio di progressione precoce rispetto alle atipiche (3

progressioni a 6 mesi, 27%) e alle composite (2 progressioni, 18%) con una significatività statistica elevata ($p=0,003$) nonostante il campione relativamente ridotto di pazienti.

A 9 mesi le tendenze sono quasi totalmente sovrapponibili. Si nota una significatività statistica ($p=0,029$) raggiunta dalla variabile “genere”, in cui i maschi sembrano avere una maggiore tendenza alla progressione precoce rispetto alle femmine.

4.4.2 RUOLO DEL MONITORAGGIO LONGITUDINALE IN RT-PCR

Variabile	Non PD, N=48	PD, N=11	p-value
T0 SQI	8,28 (6,40)	9,97 (8,26)	0,5
T1 SQI	3,89 (4,83)	5,90 (5,07)	0,2
T1 Clearance	25 (57%)	3 (30%)	0,2
T2 SQI	1,79 (3,40)	2,77 (4,29)	0,3
T2 Clearance	34 (77%)	5 (56%)	0,2

Tabella XII: correlazione tra l'andamento del monitoraggio plasmatico ai diversi timepoints (T0, T1, T2) e la resistenza primaria a 6 mesi dei pazienti dello IOV.

Variabile	Non PD, N=33	PD, N=13	p-value
T0 SQI	7,86 (6,29)	8,71 (5,17)	0,7
T1 SQI	3,32 (4,65)	4,95 (3,75)	0,2
T1 Clearance	20 (63%)	3 (27%)	0,043
T2 SQI	1,12 (2,69)	3,44 (3,79)	0,027
T2 Clearance	26 (84%)	4 (44%)	0,029

Tabella XIII: correlazione tra l'andamento del monitoraggio plasmatico ai diversi timepoints (T0, T1, T2) e la ePD a 9 mesi dei pazienti dello IOV.

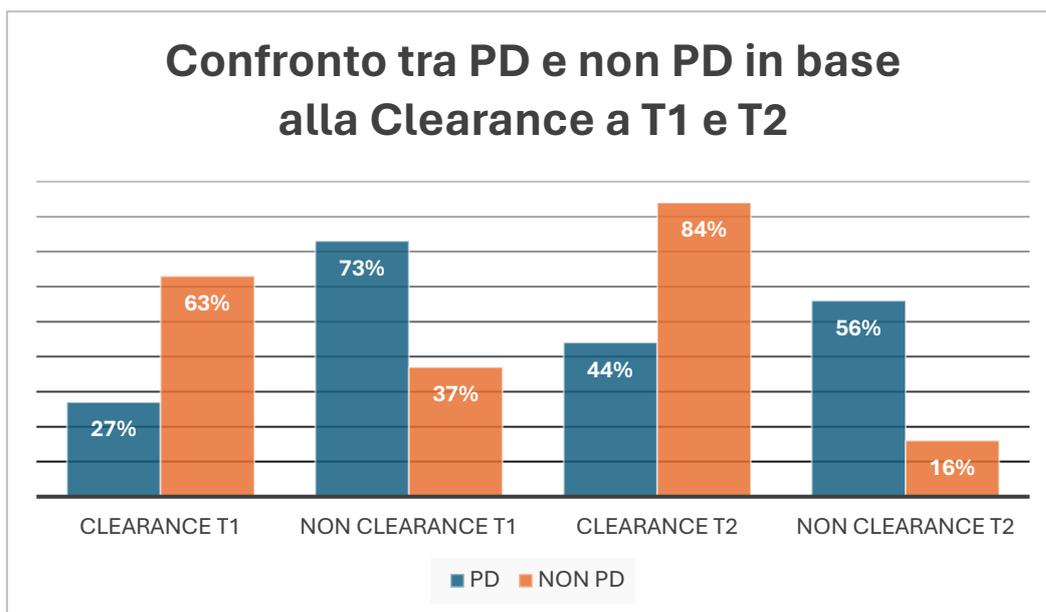


Figura 14: Confronto tra pazienti in progressione (PD) e non in progressione (non PD) entro 9 mesi dell'inizio del trattamento con osimertinib in base alla presenza di clearance ai timepoint T1 e T2.

Le modifiche quantitative della presenza di mutazione nel plasma sono state associate alla probabilità di resistenza primaria e progressione precoce.

Si considerano le variabili di SQI media e di *Clearance* (presenza *versus* assenza) agli intervalli temporali di 6 e 9 mesi.

A 6 mesi non si riscontrano ancora differenze statistiche degne di nota.

A 9 mesi si raggiunge la significatività per assenza di *clearance* al T1 ($p=0,043$), incremento di SQI al T2 ($p=0,027$) e assenza di *clearance* al T2 ($p=0,029$), ad indicare come una riduzione importante o totale del DNA tumorale circolante sia un segno prognostico positivo e di efficacia della terapia con osimertinib.

4.4.3 RUOLO DELLE COMUTAZIONI

Tra le co-mutazioni riscontrate, la presenza della co-mutazione di TP53 è associata a maggior rischio di progressione precoce di malattia è TP53: probabilità di resistenza primaria ($p=0,008$), e progressione entro 9 mesi ($p=0,007$). La progressione

precoce di malattia è più frequente nei pazienti che presentano una mutazione con perdita di funzione di questo importante oncosoppressore.

Variabile	Non PD, N=48	PD, N=11	p-value
EGFR	28 (82%)	8 (80%)	>0,9
ROS1	2 (5,9%)	0 (0%)	>0,9
BRAF	4 (12%)	0 (0%)	0,6
MET	1 (2,9%)	1 (10%)	0,4
RET	1 (2,9%)	0 (0%)	>0,9
TP53	10 (29%)	8 (80%)	0.008
RB	1 (2,9%)	1 (10%)	0,4
PIK3CA	5 (15%)	1 (10%)	>0,9

Tabella XIV: correlazione tra le comutazioni individuate in NGS basale e resistenza primaria a 6 mesi dei pazienti dello IOV.

Variabile	Non PD, N=36	PD, N=11	p-value
EGFR	22 (85%)	8 (80%)	>0,9
ROS1	2 (7,7%)	0 (0%)	>0,9
BRAF	4 (15%)	0 (0%)	0,6
MET	1 (3,8%)	1 (10%)	0,5
RET	1 (3,8%)	0 (0%)	>0,9
TP53	7 (27%)	8 (80%)	0,007
RB	1 (3,8%)	1 (10%)	0,5
PIK3CA	2 (7,7%)	1 (10%)	>0,9

Tabella XV: correlazione tra le comutazioni individuate in NGS basale e ePD a 9 mesi dei pazienti dello IOV.

4.5 ANALISI DELLA SOPRAVVIVENZA

4.5.1 POPOLAZIONE GENERALE

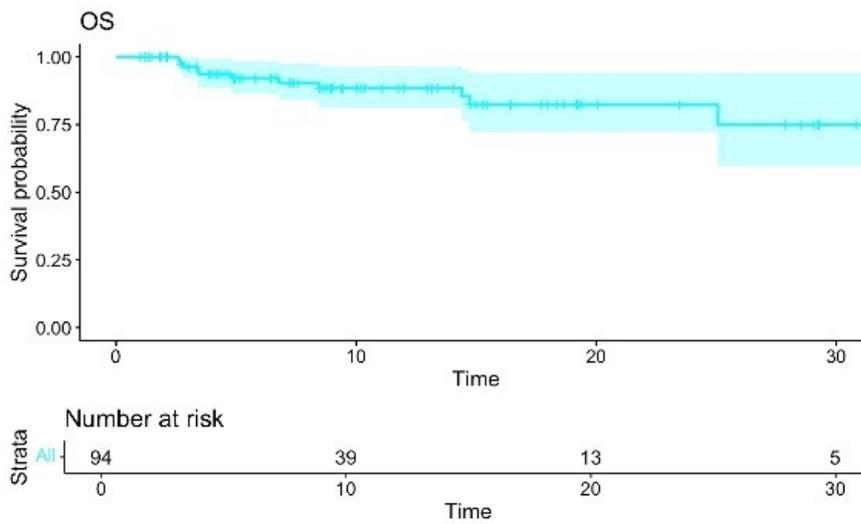


Figura 15: OS della popolazione generale.

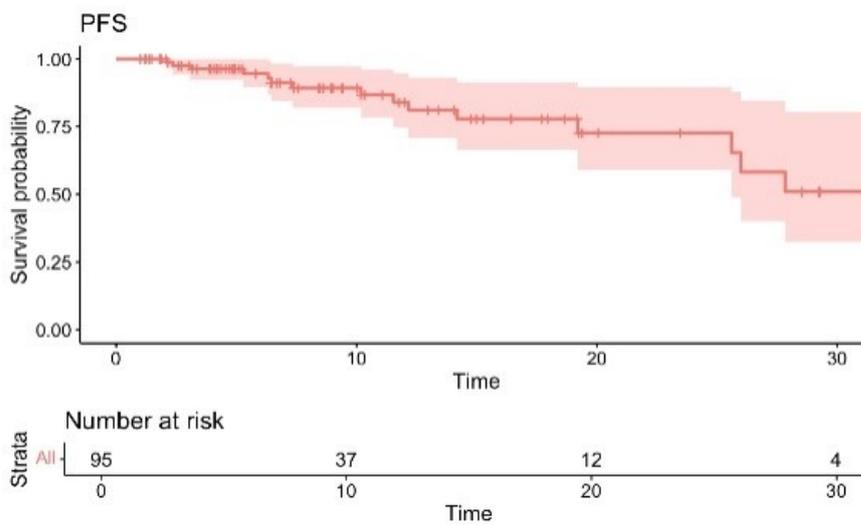


Figura 16: PFS della popolazione generale.

Le figure 15 e 16 mostrano l'andamento della *OS* e della *PFS* della popolazione in studio. Le mediane non sono state raggiunte in nessuno dei due grafici, in quanto si sono verificati pochi eventi nel relativamente breve periodo di follow-up: 15 progressioni (16%, 95% IC, 9.4%, 25%) e 11 decessi (12%, 95% IC, 6.3%, 20%).

4.5.2 PREDITTORI DI SOPRAVVIVENZA

Come specificato precedentemente (cfr. 4.2.1), il follow-up mediano (8,45 mesi, 95% CI 9.0, 13) è ancora troppo breve per avere dei numeri di eventi significativi sia in termini di progressioni di malattia (15, 16%, 95% CI 9,4%, 25%) che di decessi (11, 12%, 95% CI 6.3%, 20%).

Pertanto, l'analisi della sopravvivenza risulta al momento piuttosto immatura.

Variabile	Analisi univariata				Analisi multivariata		
	N	HR	95% CI	p-value	HR	95% CI	p-value
Genere	94						
Femmina		—	—				
Maschio		1.42	0.43, 4.67	0.6			
Età alla diagnosi	94	1.01	0.95, 1.07	0.8			
Tipo di mutazione EGFR	94						
Atipica		—	—		—	—	
Composita		2.46	0.33, 18.4	0.4	0.63	0.04, 9.80	0.7
Ex19del		0.14	0.02, 1.03	0.054	0.04	0.00, 0.64	0.023
L858E		0.53	0.10, 2.74	0.5	0.25	0.01, 5.09	0.4
ECOG PS	94						
>1		—	—				
0-1		0.64	0.14, 2.97	0.6			
Numero di siti metastatici	94						
<3		—	—				
≥3		0.84	0.18, 3.87	0.8			
TO SQI	71	1.03	0.94, 1.13	0.5			
T1 Clearance	71	0.91	0.24, 3.43	0.9			
T2 Clearance	67	0.19	0.04, 0.88	0.034	0.31	0.03, 2.96	0.3
Comutazione di p53	49	3.93	0.97, 15.9	0.054	2.04	0.11, 38.7	0.6

Tabella XVI: Regressione di Cox per OS della popolazione in studio.

Variabile	Analisi univariata				Analisi multivariata		
	N	HR	95% CI	p-value	HR	95% CI	p-value
Genere	95						
Femmina		—	—				
Maschio		2.48	0.89, 6.88	0.082			
Età alla diagnosi	95	0.96	0.92, 1.00	0.032	1.02	0.96, 1.10	0.5
Tipo di mutazione EGFR	95						
Atipica		—	—		—	—	
Composita		3.01	0.45, 20.2	0.3	0.79	0.09, 7.11	0.8
Ex19del		0.18	0.04, 0.82	0.027	0.04	0.00, 0.43	0.007
L858E		0.47	0.12, 1.90	0.3	0.28	0.04, 2.23	0.2
ECOG PS	95						
>1		—	—				
0-1		1.90	0.25, 14.5	0.5			
Numero di siti metastatici	95						
<3		—	—				
≥3		0.95	0.27, 3.38	>0.9			
TO SQI	71	1.03	0.95, 1.11	0.5			
T1 Clearance	71	0.55	0.18, 1.66	0.3			
T2 Clearance	67	0.44	0.13, 1.48	0.2			
Comutazione di p53	49	4.83	1.48, 15.8	0.009	6.98	1.19, 41.1	0.032

Tabella XVII: Regressione di Cox per PFS della popolazione in studio.

Le tabelle XV e XVI illustrano la regressione di Cox per OS e PFS nella popolazione di studio.

Nonostante il follow-up immaturo, appare chiaro il ruolo predittivo del tipo di mutazione: pazienti portatori di delezione esone 19 di EGFR presentano HR di 0,14 per OS ($p=0,054$ in univariata) e 0,18 ($p=0,027$ in univariata) per PFS.

Inoltre, i dati sulla Clearance al T2 sembrano confermare un ruolo importante della biopsia liquida nel monitoraggio dei pazienti, soprattutto per quanto concerne la OS in cui l'HR è di 0,19 ($p=0,034$ in univariata).

Si conferma il ruolo predittivo negativo della co-mutazione di TP53: HR per PFS 4.84, $p = 0.009$, che si conferma essere fattore indipendente all'analisi multivariata ($p:0.03$).

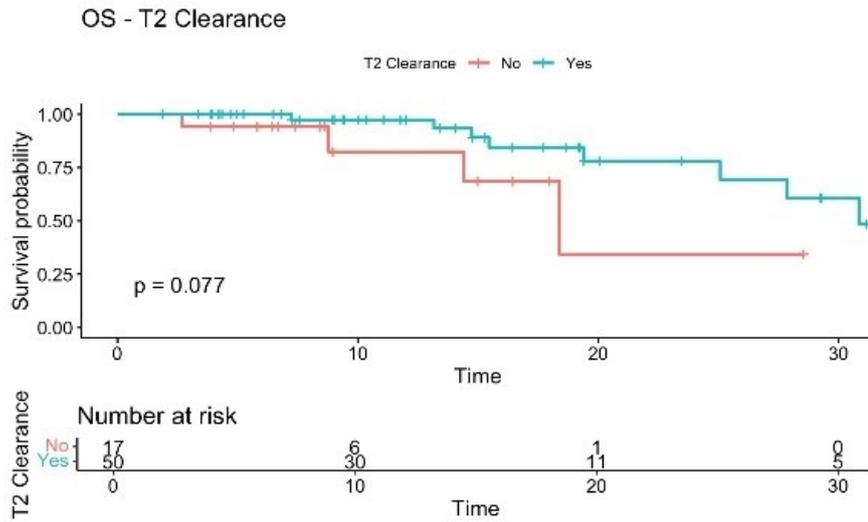


Figura 17: OS in rapporto alla Clearance del cfDNA in T2

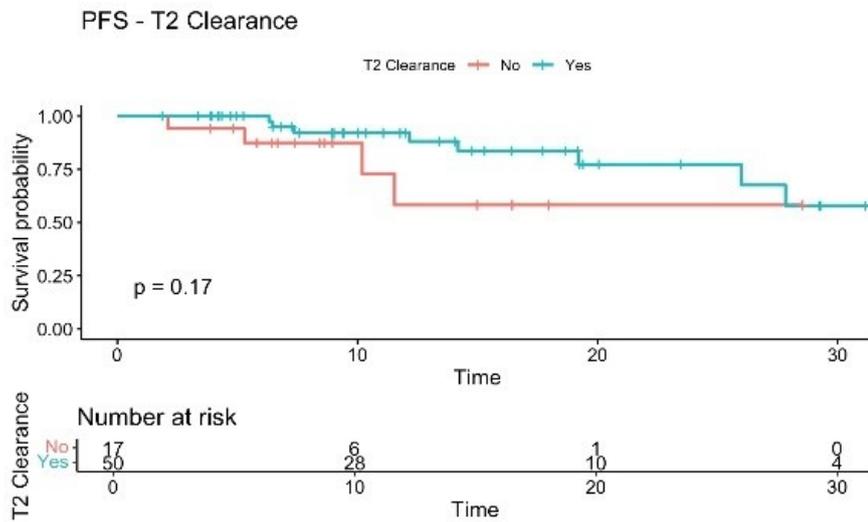


Figura 18: PFS in rapporto alla Clearance del cfDNA in T2

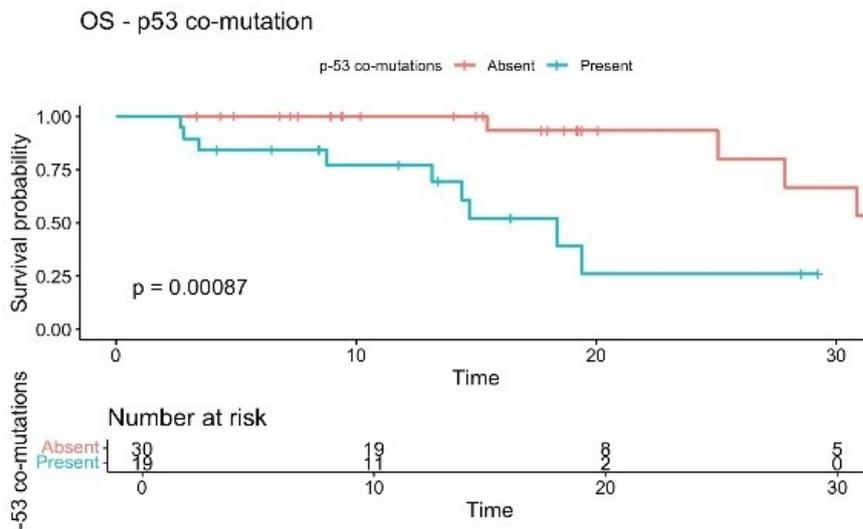


Figura 19: OS in rapporto alla presenza della co-mutazione di TP53.

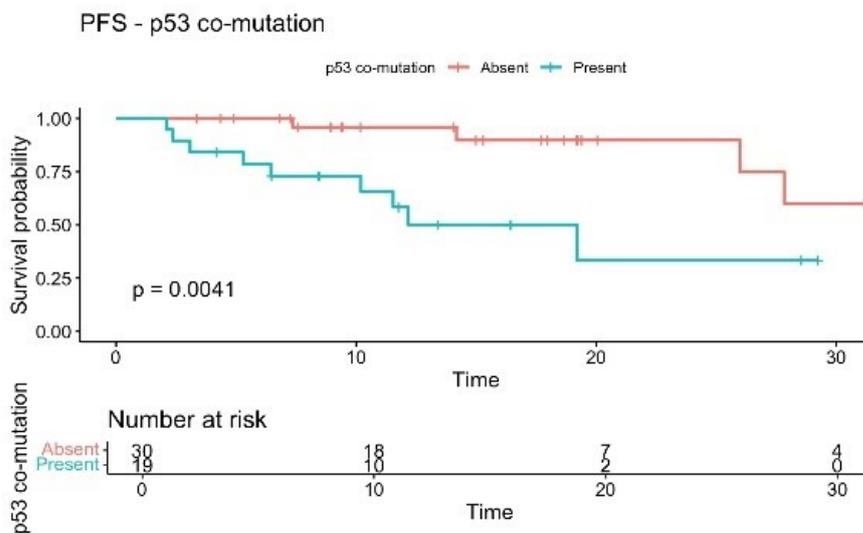


Figura 20: PFS in rapporto alla presenza della co-mutazione di TP53.

Le figure da 17 a 20 riassumono i dati di OS e PFS nelle sottocategorie di pazienti con determinate caratteristiche (*Clearance* al T1, T2 e presenza di co-mutazione di TP-53) mediante curve di Kaplan-Meier confrontate tramite log-rank test.

La correlazione tra Clearance del cfDNA di EGFR al T1 ed al T2 non è risultata correlata in maniera statisticamente significativa ad una miglior prognosi, sia in termini di OS che di PFS seppur le curve mostrino un chiaro trend. (figura 17 e 18).

Invece la correlazione tra la presenza della co-mutazione di TP53 al basale e OS e PFS viene raggiunta in modo statisticamente significativo e dimostra un andamento peggiore portatori dell'alterazione rispetto a quelli che ne sono privi. (figura 19 e 20).

5.0 DISCUSSIONE

La terapia a bersaglio molecolare nell'ambito oncologico è ormai uno standard di trattamento dei pazienti con malattia avanzata e non solo. La mutazione di EGFR nel contesto del NSCLC è sempre stato un paradigma nello studio delle neoplasie *oncogene-addicted* e i continui miglioramenti delle biotecnologie e della comprensione dell'aspetto molecolare hanno permesso lo sviluppo di farmaci via via più efficaci e sicuri. Tuttavia, rimane l'enorme problematica delle resistenze, correlata all'incredibile capacità di adattamento genico del tumore, che grazie ad una massiccia mole di mutazioni riesce a sfuggire ai meccanismi inibitori del farmaco e proliferare. I meccanismi alla base della resistenza sono molto eterogenei, in quanto si sviluppano in modi e tempi diversi: una porzione di pazienti non risponde da subito, altri inizialmente presentano un'ottima risposta al farmaco per poi andare incontro a progressione di malattia e un piccolo campione continua ad avere una stabilità di malattia anche a distanza di quasi un decennio. La resistenza primaria viene definita come il rapido sviluppo di mancata risposta alla terapia dovuta ad alterazioni iniziali del bersaglio principale. Nel caso di Osimertinib, si associa principalmente alla presenza di mutazioni rare. La resistenza secondaria, invece, si sviluppa in seguito a un'iniziale risposta al trattamento a causa di modificazioni del target oppure di attivazioni di vie parallele che bypassano l'azione del farmaco. Nel caso di Osimertinib, il meccanismo principale è legato all'amplificazione di MET (104).

In questo contesto la biopsia liquida può essere uno strumento estremamente utile, in quanto poco invasivo, facilmente ripetibile e con buona concordanza rispetto alle analisi tissutali. La biopsia liquida viene preferibilmente proposta in concerto alla biopsia tissutale tradizionale e permette di individuare le mutazioni sensibili alla terapia a bersaglio molecolare al basale e fornire un'iniziale stratificazione prognostica, nonché di segnalare lo sviluppo di meccanismi di resistenza acquisita ai TKI come osimertinib (65, 99).

L'obiettivo del nostro studio era, nell'ambito di un più ampio progetto sul ruolo della biopsia liquida nell'analisi di meccanismi di resistenza primaria e secondaria

e di stratificazione del rischio, di individuare precocemente i pazienti che possono trarre limitato beneficio dal trattamento e quelli che invece svilupperanno solo molto tardivamente resistenza acquisita.

Nei risultati preliminari descritti nel lavoro di tesi abbiamo riscontrato una buona *compliance* alle procedure del protocollo e un'elevata percentuale di campioni effettivamente valutabili per le analisi stabilite. 91 (86%) soggetti hanno svolto tutti i prelievi programmati. I prelievi complessivamente non eseguiti corrispondono a momenti in cui per motivi prevalentemente clinici i pazienti non si sono recati presso gli ambulatori per eseguire visita e prelievi standard. Tra i campioni ottenuti, due non sono risultati valutabili perché la quantità e qualità del DNA estratto non era ritenuta adeguata. Tale aspetto può essere legato a problematiche tecniche riguardo alle tempistiche di arrivo di campioni da sedi esterne allo IOV dove sono state eseguite le analisi molecolari. I tubi streck, utilizzati per il prelievo permettono infatti di essere processati sino a 5-7 giorni dopo l'esecuzione del prelievo, ma la quantità di DNA rilevabile si riduce progressivamente.

Le analisi molecolari hanno evidenziato una buona concordanza sangue-tessuto con 41 casi su 49 (84%) e 69 su 84 (82%), rispettivamente per NGS e RT-PCR, di concordanza con la biopsia tissutale, in linea con la letteratura (105, 106). È interessante notare che tutti i casi negativi alla biopsia liquida presentano un basso carico di malattia, associato a un ridotto quantitativo di cfDNA. Non sono presenti, invece, casi di negatività su tessuto associati a positività alla biopsia liquida.

Dopo aver valutato *compliance* e fattibilità delle analisi pianificate, abbiamo analizzato indicatori di attività del farmaco Osimertinib nei pazienti arruolati prospetticamente e trattati in un contesto di pratica clinica (al di fuori di studi clinici interventistici che prevedono una selezione clinica dei pazienti).

Nel lavoro di tesi, i tassi di risposta evidenziata del 67% (95% CI 54%, 77%) sono leggermente inferiori rispetto allo studio registrativo FLAURA (ORR=80%) e alla casistica *real-world* recentemente pubblicata, FLOWER (ORR=73%) (90, 107).

Tale lieve discordanza è verosimilmente da ricondurre alla presenza nella nostra casistica di mutazioni rare e composte. La tipologia di alterazione genica di EGFR influenza, infatti, in maniera significativa la sensibilità all'inibizione della proteina,

In particolare la delezione dell'esone 19 ha il maggior valore predittivo positivo, mentre le mutazioni definite rare o composite possono avere sensibilità intermedia o dimostrare resistenza primaria a Osimertinib (108, 109, 110). Nei principali studi clinici che hanno portato all'approvazione dei farmaci anti-EGFR, tra cui lo studio FLAURA erano arruolati solo pazienti con le più frequenti mutazioni sensibilizzanti di EGFR (delezione esone 19, mutazione puntiforme esone 21 L858R) (90). Le mutazioni rare, le quali includono inserzioni a livello dell'esone 19 e 20, delezioni del 18, la G719X, E709X, S768I e L861Q, sono poco studiate in letteratura, ma sembrano presentare andamenti variabili in base al tipo di farmaco utilizzato: le inserzioni del 20 rispondono poco a tutte e tre le generazioni di anti-EGFR, la G719X, E709X e S768I hanno risposte buone ad afatinib, mentre la L861Q sembra essere sensibile a osimertinib (56, 111, 112, 113, 114). Da questo si ricava che il mondo del NSCLC EGFR mutato è molto più complesso di quanto si credesse fino a pochi anni fa, rendendo necessari ulteriori studi atti a personalizzare ulteriormente la terapia a bersaglio molecolare.

Il profilo di tollerabilità evidenziato nei pazienti inclusi nello studio di tesi, appare significativamente migliore rispetto al FLAURA (8,3% vs 34% di eventi avversi di grado 3 o superiore), anche se potrebbe dipendere dalla durata ridotta del follow-up. Ciononostante, abbiamo evidenziato tre eventi che hanno portato alla sospensione del trattamento, impattando quindi in maniera significativa il percorso terapeutico del paziente.

Le caratteristiche cliniche dei pazienti non hanno dimostrato associazioni statisticamente rilevanti con l'andamento della terapia e la probabilità di progressione di malattia, ad esclusione dell'abitudine tabagica. In particolare, i fumatori attivi o ex fumatori hanno un rischio significativamente ($p=0,040$) maggiore di sviluppare resistenza primaria ad Osimertinib. Le mutazioni sensibilizzanti di EGFR sono tipiche della popolazione con limitata o nulla esposizione tabagica. È probabile che l'esposizione al fumo renda la malattia maggiormente eterogenea e quindi limiti l'*oncogene addiction* connessa all'alterazione genica di *Egfr*.

L'importanza di individuare precocemente i pazienti che non avranno beneficio prolungato è elevata perché rappresentano un gruppo prognostico sfavorevole anche riguardo alla risposta alle linee successive.

Al basale 67 pazienti erano positivi alla mutazione di EGFR e la positività della mutazione non è stata associata in maniera significativa a rischio di resistenza primaria o progressione precoce.

Il monitoraggio mediante biopsia liquida ha evidenziato la *clearance* del cfDNA in 40 (53%) pazienti al T1 e 53 (76%) al T2. L'assenza di *clearance* è stata associata in maniera statisticamente significativa con la probabilità di progressione precoce (9 mesi dall'inizio del follow-up, $p=0,043$ e $p=0,029$). In analisi multivariata si perde l'effetto positivo della *clearance* a causa del ridotto numero di pazienti reclutati al momento della stesura della tesi. In aggiunta, potrebbe essere correlato alla percentuale elevata di pazienti con mutazioni diverse dalla ex19del che non presentano *clearance* al T2 (8 su 17, 47%).

Tale risultato è un importante dato a sostegno del ruolo della biopsia liquida come strumento in grado di predire precocemente la risposta e l'andamento della terapia. Altri studi hanno confermato l'importanza di raggiungere la *clearance* dopo l'inizio della terapia con diversi intervalli temporali: Lee et al. hanno effettuato analisi su plasma ogni 8 settimane fino alla progressione di malattia e sono emerse differenze importanti in termini di *PFS* tra chi aveva raggiunto la *clearance* e gli altri (10,1 mesi vs 6,3 mesi). Zhou et al. hanno sfruttato i dati del FLAURA per effettuare studi sulla biopsia liquida dei pazienti al basale, dopo 3 e 6 settimane dall'inizio della terapia con osimertinib. Anche in questo caso la *PFS* è nettamente favorevole per coloro che hanno raggiunto la *clearance* (13,5 vs 8,3 mesi al prelievo dopo 6 settimane). Lo stesso procedimento ha dato risultati sovrapponibili nello studio AURA, con prelievi al basale e dopo 6 settimane e una *PFS* favorevole ai soggetti con *clearance* (10,9 vs 5,5 mesi) (99, 115, 116, 117). Questi risultati rimarcano il possibile ruolo della biopsia liquida come predittore precoce dell'andamento della terapia e dello sviluppo di resistenze.

Nella nostra casistica appare molto rilevante evidenziare che, seppur con i limiti di una numerosità ancora ridotta, la significatività statistica è stata raggiunta anche per

la mancata *clearance* al T1, indicando che è possibile monitorare nel plasma i cambiamenti biologici indotti dal trattamento sulla neoplasia anche in maniera molto precoce.

Un ruolo prognostico importante viene assunto dalle co-mutazioni rilevate al basale. In particolare, la più rilevante sembra essere la perdita di funzione di *Tp53*: è la più frequentemente individuata (19 pazienti, 18%) e anche quella maggiormente associata con la progressione della malattia entro 9 mesi (8 progressioni vs 10 non progressioni, $p=0,008$). Nel contesto del NSCLC con EGFR mutato questo dato si riscontra anche nello studio RELAY in termini di PFS (mediana 12,25 vs 19,35 mesi) e di durata della risposta al trattamento (mediana 15,2 vs 18,2 mesi). In un altro studio italiano retrospettivo, si è notato un ruolo soprattutto a carico della mutazione dell'esone 8 di *Tp53* per quanto riguarda la PFS (mediana 5,8 mesi vs 14,4 mesi). Anche in uno studio coreano che analizzava varie comutazioni, *Tp53* ha riportato un netto peggioramento della PFS (8,9 vs 12,8 mesi). Recentemente una retrospettiva cinese ha individuato una minore risposta agli anti-EGFR di terza generazione nei pazienti con mutazioni a livello della alfa-elica di p53 in termini di OS (12,2 vs 21,7 mesi). Nel primo studio citato le analisi molecolari si sono svolte mediante biopsia liquida come in questo lavoro di tesi, mentre negli altri tre su tessuto, a sottolineare la comparabilità dei due metodi (118, 119, 120, 121). I pazienti con co-mutazione di *Tp53* presentano per la maggior parte mutazioni diverse da ex19del (11 su 19, 58%).

I punti di forza del nostro studio sono sicuramente la sua natura multicentrica e prospettica, che limita i bias legati alla selezione del paziente e ai percorsi del singolo centro. Inoltre, la popolazione è composta da pazienti *real-world*, con criteri di inclusione meno stringenti e più aderenti alla pratica clinica rispetto ad altri studi svolti sull'argomento. Anche l'aspetto molecolare è un punto di forza, poiché le analisi vengono effettuate tutte in modo centralizzato, evitando possibili errori derivanti da tecniche o macchinari diversi. I dati dello studio possono essere un'importante piattaforma per eventuali lavori successivi, tra cui un focus approfondito sul confronto tra la biopsia liquida e tissutale nella gestione del follow-up e ulteriori analisi con altri biomarcatori.

I limiti dello studio riguardando principalmente la brevità del follow-up e i numeri ancora limitati di pazienti coinvolti, che attualmente non permettono di ottenere dati statisticamente significativi per *end point* importanti come OS. Tuttavia, i risultati statisticamente significativi ottenuti nonostante numeri così ridotti indicano l'elevato valore predittivo negativo della mancata *clearance* della mutazione di EGFR nel plasma dopo 28 giorni dall'inizio della terapia e, ancor più, della presenza della co-mutazione di *Tp53* riscontrata nel plasma al basale.

Le possibili applicazioni del corrente lavoro di tesi riguardano la possibilità di creare una stratificazione predittiva del beneficio a lungo termine delle terapie a bersaglio molecolare. La prospettiva di personalizzare il follow-up, con tempi di rivalutazione diversi per ogni paziente in base alla classe di rischio. In futuro, sarà possibile disegnare degli studi clinici interventistici con una selezione più precisa dei pazienti adatti a trattamenti intensivi o ad un cambiamento precoce di terapia (10 o 28 giorni) per evitare di impattare negativamente sulla sopravvivenza.

A tal proposito, gli studi FLAURA-2 e MARIPOSA hanno individuato un beneficio importante in specifici sottogruppi di pazienti: nel primo caso la combinazione di Osimertinib e platino-pemetrexed ha dimostrato una migliore PFS nei pazienti con metastasi cerebrali ed ECOG PS 1 al basale. Nel secondo trial, la terapia combinata di Amivantamab-Lazertinib (anti-MET e anti-EGFR) ha dimostrato un beneficio in termini di PFS indipendentemente dalle caratteristiche cliniche dei pazienti, ma in particolare in quelli ad alto rischio (metastasi cerebrali, epatiche, mutazione di *Tp53* al basale, e assenza di *clearance* del cfDNA di EGFR a 9 settimane dall'inizio della terapia). Tuttavia, si tratta di regimi terapeutici ad alta tossicità, i quali necessitano di *biomarker* in grado di individuare il singolo paziente che possa beneficiarne maggiormente; in questo contesto le analisi con biopsia liquida possono giocare un ruolo importante nel futuro prossimo. (122, 123)

In conclusione, seppure i risultati siano incoraggianti, è necessario aumentare nei prossimi mesi la numerosità campionaria e la durata del follow-up al fine di produrre dati che possano permettere la costruzione di modelli predittivi compositi basati sulla biopsia liquida. Infine, sarebbe auspicabile applicare le conoscenze

acquisite per svolgere una valutazione prospettica in studi interventistici futuri, in modo da ottenere risultati sempre più specifici per il singolo paziente.

6. BIBLIOGRAFIA

1. IARC, Cancer Today, *Globocan (2022)*, consultato il 7 marzo 2024.
<https://gco.iarc.fr/today/en>
2. Global Burden of Disease Cancer Collaboration; Fitzmaurice C et al. The Global Burden of Cancer 2013. *JAMA Oncol.* 2015 Jul;1(4):505-27.
3. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021 May;71(3):209-249.
4. World Health Organization (WHO). WHO global report on trends in prevalence of tobacco smoking 2000-2025. 2nd ed. WHO.
5. AIOM. Neoplasie del polmone, linee guida. 2021;607.
6. Lewis DR, Check DP, Caporaso NE, Travis WD, Devesa SS. US lung cancer trends by histologic type. *Cancer.* 2014 Sep 15;120(18):2883-92.
7. Barta JA, Powell CA, Wisnivesky JP. Global Epidemiology of Lung Cancer. *Annals of Global Health.* 22 gennaio 2019;85(1):8.

8. Malhotra J, Malvezzi M, Negri E, La Vecchia C, Boffetta P. Risk factors for lung cancer worldwide. *Eur Respir J*. 2016 Sep;48(3):889-902.
9. Vieira AR, Abar L, Vingeliene S, Chan DS, Aune D, Navarro-Rosenblatt D, Stevens C, Greenwood D, Norat T. Fruits, vegetables and lung cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Ann Oncol*. 2016 Jan;27(1):81-96.
10. Sinha R, Kulldorff M, Swanson CA, Curtin J, Brownson RC, Alavanja MC. Dietary heterocyclic amines and the risk of lung cancer among Missouri women. *Cancer Res*. 2000 Jul 15;60(14):3753-6.
11. Guertin KA, Freedman ND, Loftfield E, Graubard BI, Caporaso NE, Sinha R. Coffee consumption and incidence of lung cancer in the NIH-AARP Diet and Health Study. *Int J Epidemiol*. 2016 Jun;45(3):929-39.
12. Bagnardi V, Rota M, Botteri E, Scotti L, Jenab M, Bellocco R, Tramacere I, Pelucchi C, Negri E, La Vecchia C, Corrao G, Boffetta P. Alcohol consumption and lung cancer risk in never smokers: a meta-analysis. *Ann Oncol*. 2011 Dec;22(12):2631-2639.
13. Susan T. Mayne, Joan Buenconsejo, Dwight T. Janerich, Previous Lung Disease and Risk of Lung Cancer among Men and Women Nonsmokers, *American Journal of Epidemiology*, Volume 149, Issue 1, 1 January 1999, Pages 13–20,

14. Wu AH, Fontham ET, Reynolds P, Greenberg RS, Buffler P, Liff J, Boyd P, Henderson BE, Correa P. Previous lung disease and risk of lung cancer among lifetime nonsmoking women in the United States. *Am J Epidemiol.* 1995 Jun 1;141(11):1023-32.
15. Caramori G, Casolari P, Cavallesco GN, Giuffrè S, Adcock I, Papi A. Mechanisms involved in lung cancer development in COPD. *Int J Biochem Cell Biol.* 2011 Jul;43(7):1030-44.
16. Cabrera-Sanchez J, Cuba V, Vega V, Van der Stuyft P, Otero L. Lung cancer occurrence after an episode of tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Eur Respir Rev.* 2022 Jul 27;31(165):220025.
17. IARC Monographs, Chemical agents and related occupations. Volume 100 F. A review of human carcinogens. Lyon, WHO/IARC, 2012.
18. Klebe S, Leigh J, Henderson DW, Nurminen M. Asbestos, Smoking and Lung Cancer: An Update. *Int J Environ Res Public Health.* 2019 Dec 30;17(1):258.
19. Hammond EC, Selikoff IJ, Seidman H. Asbestos exposure, cigarette smoking and death rates. *Ann N Y Acad Sci.* 1979;330:473-90.
20. Ngamwong Y., Tangamornsuksan W., Lohitnavy O., Chaiyakunapruk N., Scholfield C.N., Reisfeld B., Lohitnavy M. Additive Synergism between

- Asbestos and Smoking in Lung Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE*. 2015
21. Rey-Brandariz J, Martínez C, Candal-Pedreira C, Pérez-Ríos M, Varela-Lema L, Ruano-Ravina A. Occupational exposure to respirable crystalline silica and lung cancer: a systematic review of cut-off points. *Environ Health*. 2023 Nov 30;22(1):82.
 22. Cheng ES, Egger S, Hughes S, Weber M, Steinberg J, Rahman B, Worth H, Ruano-Ravina A, Rawstorne P, Yu XQ. Systematic review and meta-analysis of residential radon and lung cancer in never-smokers. *Eur Respir Rev*. 2021 Feb 2;30(159):200230.
 23. Lubin JH. Radon and lung cancer risk: a joint analysis of 11 underground miners studies. Washington, National Institutes of Health, 1994.
 24. Rota M, Bosetti C, Boccia S, Boffetta P, La Vecchia C. Occupational exposures to polycyclic aromatic hydrocarbons and respiratory and urinary tract cancers: an updated systematic review and a meta-analysis to 2014. *Arch Toxicol*. 2014 Aug;88(8):1479-90.
 25. Lissowska J, Bardin-Mikolajczak A, Fletcher T, Zaridze D, Szeszenia-Dabrowska N, Rudnai P, Fabianova E, Cassidy A, Mates D, Holcatova I, Vitova V, Janout V, Mannetje A, Brennan P, Boffetta P. Lung cancer and indoor pollution from heating and cooking with solid fuels: the IARC international

multicentre case-control study in Eastern/Central Europe and the United Kingdom. *Am J Epidemiol.* 2005 Aug 15;162(4):326-33.

26. Laden F, Schwartz J, Speizer FE, Dockery DW. Reduction in fine particulate air pollution and mortality: Extended follow-up of the Harvard Six Cities study. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006 Mar 15;173(6):667-72.
27. International Agency for Research on Cancer. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: Outdoor air pollution. Vol. 109. Lyon: IARC, 2016.
28. Benbrahim-Tallaa, et al. International Agency For Research on Cancer Monograph Working Group. Carcinogenicity of diesel-engine and gasoline-engine exhaust and some nitroarenes. *Lancet Oncol.* 2012 Jul;13(7):663-4.
29. Matakidou A, Eisen T, Houlston RS. Systematic review of the relationship between family history and lung cancer risk. *Br J Cancer.* 2005 Oct 3;93(7):825-33.
30. McKay JD, Hung RJ, Gaborieau V, et al. Lung cancer susceptibility locus at 5p15.33. *Nat Genet.* 2008 Dec;40(12):1404-6.
31. Thorgeirsson TE, Geller F, Sulem P, et al. A variant associated with nicotine dependence, lung cancer and peripheral arterial disease. *Nature.* 2008 Apr 3;452(7187):638-642.

32. Liu JZ, Tozzi F, Waterworth DM, et al. Meta-analysis and imputation refines the association of 15q25 with smoking quantity. *Nat Genet.* 2010 May;42(5):436-40.
33. Byun J, Han Y, Li Y, Xia J, et al. Cross-ancestry genome-wide meta-analysis of 61,047 cases and 947,237 controls identifies new susceptibility loci contributing to lung cancer. *Nat Genet.* 2022 Aug;54(8):1167-1177.
34. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2012; 62:10-29.
35. Thun MJ, Carter BD, Feskanich D, Freedman ND, Prentice R, Lopez AD, Hartge P, Gapstur SM. 50-year trends in smoking-related mortality in the United States. *N Engl J Med.* 2013 Jan 24;368(4):351-64.
36. Crispo A, Brennan P, Jöckel KH, et al. The cumulative risk of lung cancer among current, ex- and never-smokers in European men. *Br J Cancer.* 2004;91:1280-6.
37. Hahn EE, Gould MK. Lung Cancer Screening and Smoking Cessation: Never Too Early or Too Late. *J Natl Cancer Inst.* 2018 Nov 1;110(11):1157-1158.
38. Istituto Superiore di Sanità. Giornata mondiale senza tabacco: fumano ancora due italiani su dieci, al sud la percentuale piu' alta di fumatrici CS N°12/2019. Available from: <https://ufficiostampa.iss.it/?p=1840>.

39. Warren GW, Cummings KM. Tobacco and lung cancer: risks, trends, and outcomes in patients with cancer. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2013:359-64.
40. Li Y, Hecht SS. Carcinogenic components of tobacco and tobacco smoke: A 2022 update. *Food Chem Toxicol*. 2022 Jul;165:113179.
41. Cao DJ, Aldy K, Hsu S, McGetrick M, Verbeck G, De Silva I, Feng SY. Review of Health Consequences of Electronic Cigarettes and the Outbreak of Electronic Cigarette, or Vaping, Product Use-Associated Lung Injury. *J Med Toxicol*. 2020 Jul;16(3):295-310.
42. Patnode CD, Henderson JT, Coppola EL, Melnikow J, Durbin S, Thomas RG. Interventions for Tobacco Cessation in Adults, Including Pregnant Persons: Updated Evidence Report and Systematic Review for the US Preventive Services Task Force. *JAMA*. 2021 Jan 19;325(3):280-298.
43. Walker N, Parag V, Verbiest M, Laking G, Laugesen M, Bullen C. Nicotine patches used in combination with e-cigarettes (with and without nicotine) for smoking cessation: a pragmatic, randomised trial. *Lancet Respir Med*. 2020;8(1):54- 64.
44. Caponnetto P, Campagna D, Cibella F, et al. Efficiency and Safety of an e-Lectronic cigAreTte (ECLAT) as tobacco cigarettes substitute: a prospective 12-month randomized control design study. *PLoS One*. 2013;8(6):e66317

45. National Lung Screening Trial Research Team, Aberle DR, Adams AM, et al. Reduced lung-cancer mortality with low-dose computed tomographic screening. *N Engl J Med*. 2011;365:395-409.
46. . Krist AH, Davidson KW, Mangione CM, et al. Screening for Lung Cancer: US Preventive Services Task Force Recommendation Statement. *JAMA*. 2021 Mar 9;325(10):962-970.
47. Kauczor HU, Baird AM, Blum TG, Bonomo L, Bostantzoglou C, Burghuber O, Čepická B, Comanescu A, Couraud S, Devaraj A, Jespersen V, Morozov S, Nardi Agmon I, Peled N, Powell P, Prosch H, Ravara S, Rawlinson J, Revel MP, Silva M, Snoeckx A, van Ginneken B, van Meerbeeck JP, Vardavas C, von Stackelberg O, Gaga M; European Society of Radiology (ESR) and the European Respiratory Society (ERS). ESR/ERS statement paper on lung cancer screening. *Eur Respir J*. 2020 Feb 12;55(2):1900506.
48. Thoracic Tumours. WHO Classification of Tumours, 5th Edition, IARC, Lyon 2021
49. Nicholson AG, Tsao MS, Beasley MB, Borczuk AC, Brambilla E, Cooper WA, Dacic S, Jain D, Kerr KM, Lantuejoul S, Noguchi M, Papotti M, Rekhtman N, Scagliotti G, van Schil P, Sholl L, Yatabe Y, Yoshida A, Travis WD. The 2021 WHO Classification of Lung Tumors: Impact of Advances Since 2015. *J Thorac Oncol*. 2022 Mar;17(3):362-387.

50. Fletcher M., Diagnostic Histopathology of Tumors 2 Volume Set 5th Edition, s.l., Elsevier, 2021.
51. 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.
52. Imyanitov EN, Iyevleva AG, Levchenko EV. Molecular testing and targeted therapy for non-small cell lung cancer: Current status and perspectives. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2021 Jan;157:103194.
53. Mitiushkina NV, Kholmatov MM, Venina AR, Tiurin VI, Yanus GA, Sokolova TN, Yatsuk OS, Zaitseva OA, Ivantsov AO, Kuligina ES, Togo AV, Imyanitov EN. PCR-based detection of EGFR, ALK, KRAS and BRAF mutations in Russian patients with lung adenocarcinoma: a single-center experience. *Neoplasma.* 2018 Nov 15;65(6):972-979.
54. Herbst RS, Morgensztern D, Boshoff C. The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nature.* 2018 Jan 24;553(7689):446-454. doi: 10.1038/nature25183. PMID: 29364287 Harrison PT, Vyse S, Huang PH. Rare

- epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in non-small cell lung cancer. *Semin Cancer Biol.* 2020 Apr;61:167-179.
55. Sokolenko AP, Imyanitov EN. Molecular Diagnostics in Clinical Oncology. *Front Mol Biosci.* 2018 Aug 27;5:76.
56. Harrison PT, Vyse S, Huang PH. Rare epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in non-small cell lung cancer. *Semin Cancer Biol.* 2020 Apr;61:167-179.
57. Recondo, G., Facchinetti, F., Olaussen, K.A. *et al.* Making the first move in *EGFR*-driven or *ALK*-driven NSCLC: first-generation or next-generation TKI?. *Nat Rev Clin Oncol* 15, 694–708 (2018).
58. Lin JJ, Zhu VW, Yoda S, Yeap BY, Schrock AB, Dagogo-Jack I, Jessop NA, Jiang GY, Le LP, Gowen K, Stephens PJ, Ross JS, Ali SM, Miller VA, Johnson ML, Lovly CM, Hata AN, Gainor JF, Iafrate AJ, Shaw AT, Ou SI. Impact of EML4-ALK Variant on Resistance Mechanisms and Clinical Outcomes in ALK-Positive Lung Cancer. *J Clin Oncol.* 2018 Apr 20;36(12):1199-1206.
59. Roys A, Chang X, Liu Y, Xu X, Wu Y, Zuo D. Resistance mechanisms and potent-targeted therapies of ROS1-positive lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2019 Oct;84(4):679-688.

60. Dziadziuszko R, Le AT, Wrona A, Jassem J, Camidge DR, Varela-Garcia M, Aisner DL, Doebele RC (2016) An activating KIT mutation induces crizotinib resistance in ROS1-positive lung cancer. *J Thorac Oncol* 11:1273–1281
61. 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 BRAF^{V600E}-mutant metastatic non-small-cell lung cancer: an open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2017 Oct;18(10):1307-1316.
62. L. Paz-Ares, R.C. Doebele, A.F. Farago, S.V. Liu, S.P. Chawla, D. Tosi, C.M. Blakely, J.C. Krauss, D. Sigal, L. Bazhenova, T. John, B. Besse, J. Wolf, T. Seto, E. Chow-Maneval, C. Ye, B. Simmons, G.D. Demetri, 113O - Entrectinib in NTRK fusion-positive non-small cell lung cancer (NSCLC): Integrated analysis of patients (pts) enrolled in STARTRK-2, STARTRK-1 and ALKA-372-001, *Annals of Oncology*, Volume 30, Supplement 2, 2019, Pages 1148-1149
63. C.R. Lindsay, M. Jamal-Hanjani, M. Forster, F. Blackhall,, KRAS: Reasons for optimism in lung cancer, *European Journal of Cancer*, Volume 99, 2018, Pages 20-27
64. Garon EB, Rizvi NA, Hui R, Leighl N, Balmanoukian AS, Eder JP, Patnaik A, Aggarwal C, Gubens M, Horn L, Carcereny E, Ahn MJ, Felip E, Lee JS, Hellmann MD, Hamid O, Goldman JW, Soria JC, Dolled-Filhart M, Rutledge

- RZ, Zhang J, Lunceford JK, Rangwala R, Lubiniecki GM, Roach C, Emancipator K, Gandhi L; KEYNOTE-001 Investigators. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2015 May 21;372(21):2018-28.
65. Postmus PE, Kerr KM, Oudkerk M, Senan S, Waller DA, Vansteenkiste J, Escriu C, Peters S; ESMO Guidelines Committee. Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2017 Jul 1
66. Pignon JP, Tribodet H, Scagliotti GV, Douillard JY, Shepherd FA, Stephens RJ, Dunant A, Torri V, Rosell R, Seymour L, Spiro SG, Rolland E, Fossati R, Aubert D, Ding K, Waller D, Le Chevalier T; LACE Collaborative Group. Lung adjuvant cisplatin evaluation: a pooled analysis by the LACE Collaborative Group. *J Clin Oncol*. 2008 Jul 20;26(21):3552-9.
67. Collins LG, Haines C, Perkel R, Enck RE. Lung cancer: diagnosis and management. *Am Fam Physician*. 2007 Jan 1;75(1):56-63.
68. Beckles MA, Spiro SG, Colice GL, Rudd RM. Initial evaluation of the patient with lung cancer: symptoms, signs, laboratory tests, and paraneoplastic syndromes. *Chest*. 2003 Jan;123(1 Suppl):97S-104S.
69. Pelosof LC, Gerber DE. Paraneoplastic syndromes: an approach to diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc*. 2010 Sep;85(9):838-54.

70. Efthymiou C, Spyratos D, Kontakiotis T. Endocrine paraneoplastic syndromes in lung cancer. *Hormones (Athens)*. 2018 Sep;17(3):351-358.
71. Nooreldeen R, Bach H. Current and Future Development in Lung Cancer Diagnosis. *Int J Mol Sci*. 2021 Aug 12;22(16):8661.
72. Panunzio A, Sartori P. Lung Cancer and Radiological Imaging. *Curr Radiopharm*. 2020;13(3):238-242.
73. Farsad M. FDG PET/CT in the Staging of Lung Cancer. *Curr Radiopharm*. 2020;13(3):195-203.
74. Trisolini R, Natali F, Fois AG. Up-to-date role of interventional pulmonology in the diagnosis and staging of nonsmall-cell lung cancer. *Shanghai Chest* 2017.
75. Livi V, Paioli D, Cancellieri A, Betti S, Natali F, Ferrari M, Fiorentino M, Trisolini R. Diagnosis and Molecular Profiling of Lung Cancer by Percutaneous Ultrasound-Guided Biopsy of Superficial Metastatic Sites Is Safe and Highly Effective. *Respiration*. 2021;100(6):515-522.
76. Frank C. Detterbeck, The eighth edition TNM stage classification for lung cancer: What does it mean on main street? *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, Volume 155, Issue 1, 2018, Pages 356-359, ISSN 0022-5223.

77. Travis WD, Eisele M, Nishimura KK, Aly R, Bertoglio P, Chou TY, Detterbeck FC, Donnington J, Fang W, Joubert P, Kernstine K, Kim YT, Lievens Y, Liu H, Lyons G, Mino-Kenudson M, Nicholson AG, Papotti M, Rami-Porta R, Rusch V, Sakai S, Ugalde P, Van Schil P, Yang J, Cilento VJ, Yotsukura M, Asamura H; Members of the International Association for the Study of Lung Cancer Staging and Prognostic Factors Committee, Members of the Advisory Boards, and Participating Institutions of the Lung Cancer Domain. The IASLC Lung Cancer Staging Project: Recommendation to Introduce Spread Through Air Spaces (STAS) as a Histologic Descriptor in the 9th Edition of the TNM Classification of Lung Cancer. Analysis of 4,061 Pathologic Stage I Non-Small cell Lung Carcinomas. *J Thorac Oncol.* 2024 Mar 18:S1556-0864(24)00122-9.
78. Fong KM, Rosenthal A, Giroux DJ, Nishimura KK, Erasmus J, Lievens Y, Marino M, Marom EM, Putora PM, Singh N, Suárez F, Rami-Porta R, Detterbeck F, Eberhardt WE, Asamura H; Members of the International Association for the Study of Lung Cancer Staging and Prognostic Factors Committee, Members of the Advisory Boards, and Participating Institutions of the Lung Cancer Domain.. The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for the Revision of the M Descriptors in the Forthcoming 9th edition of the TNM Classification of Lung Cancer. *J Thorac Oncol.* 2024 Feb 4:S1556-0864(24)00060-1.
79. A. Brunelli, A. Charloux, C. T. Bolliger, G. Rocco, J-P. Sculier, G. Varela, M. Licker, M. K. Ferguson, C. Faivre-Finn, R. M. Huber, E.

M. Clini, T. Win, D. De Ruyscher, L. Goldman on behalf of the European Respiratory Society and European Society of Thoracic Surgeons joint task force on fitness for radical therapy *European Respiratory Journal* 2009 34: 17-41;

80. 149. Yan TD, Black D, Bannon PG, et al. Systematic review and metaanalysis of randomized and non-randomized Trials on safety and efficacy of videoassisted thoracic surgery lobectomy for early-stage non-small cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2009;27:2553-62

81. A.V. Louie, D.A. Palma, M. Dahele, *et al.*, Management of early-stage non-small cell lung cancer using stereotactic ablative radiotherapy: controversies, insights, and changing horizons, *Radiother Oncol*, 114 (2015), pp. 138-147

82. H. Tekatli, N. Haasbeek, M. Dahele, *et al.*, Outcomes of hypofractionated high-dose radiotherapy in poor-risk patients with “ultracentral” non-small cell lung cancer, *J Thorac Oncol*, 11 (2016), pp. 1081-1089

83. E. Lim, G. Harris, A. Patel, *et al.*, Preoperative versus postoperative chemotherapy in patients with resectable non-small cell lung cancer: systematic review and indirect comparison meta-analysis of randomized trials, *J Thorac Oncol*, 4 (2009), pp. 1380-1388

84. Tsuboi M, Herbst RS, John T, Kato T, Majem M, Grohé C, Wang J, Goldman JW, Lu S, de Marinis F, Shepherd FA, Lee KH, Le NT, Dechaphunkul A,

- Kowalski D, Bonanno L, Dómine M, Poole L, Bolanos A, Rukazenkov Y, Wu YL. Summary of Research: Overall Survival with Osimertinib in Resected EGFR-Mutated NSCLC. *Target Oncol.* 2024 Mar;19(2):131-134.
85. Tsuboi M, Herbst RS, John T, Kato T, Majem M, Grohé C, Wang J, Goldman JW, Lu S, Su WC, de Marinis F, Shepherd FA, Lee KH, Le NT, Dechaphunkul A, Kowalski D, Poole L, Bolanos A, Rukazenkov Y, Wu YL; ADAURA Investigators. Overall Survival with Osimertinib in Resected *EGFR*-Mutated NSCLC. *N Engl J Med.* 2023 Jul 13;389(2):137-147.
86. Puri S, Saltos A, Perez B, Le X, Gray JE. Locally Advanced, Unresectable Non-Small Cell Lung Cancer. *Curr Oncol Rep.* 2020 Mar 5;22(4):31.
87. Ferrara MG, Di Noia V, D'Argento E, Vita E, Damiano P, Cannella A, Ribelli M, Pilotto S, Milella M, Tortora G, Bria E. Oncogene-Addicted Non-Small-Cell Lung Cancer: Treatment Opportunities and Future Perspectives. *Cancers (Basel).* 2020 May 8;12(5):1196.
88. He J, Huang Z, Han L, Gong Y, Xie C. Mechanisms and management of 3rd-generation EGFR-TKI resistance in advanced non-small cell lung cancer (Review). *Int J Oncol.* 2021 Nov;59(5):90.
89. Kobayashi Y, Mitsudomi T. Not all epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer are created equal: Perspectives for individualized treatment strategy. *Cancer Sci.* 2016 Sep;107(9):1179-86.

90. oria JC, Ohe Y, Vansteenkiste J, Reungwetwattana T, Chewaskulyong B, Lee KH, Dechaphunkul A, Imamura F, Nogami N, Kurata T, Okamoto I, Zhou C, Cho BC, Cheng Y, Cho EK, Voon PJ, Planchard D, Su WC, Gray JE, Lee SM, Hodge R, Marotti M, Rukazenzov Y, Ramalingam SS; FLAURA Investigators. Osimertinib in Untreated EGFR-Mutated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2018 Jan 11;378(2):113-125.
91. L.E. Hendriks, K.M. Kerr, J. Menis, T.S. Mok, U. Nestle, A. Passaro, S. Peters, D. Planchard, E.F. Smit, B.J. Solomon, G. Veronesi, M. Reck, Oncogene-addicted metastatic non-small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up, *Annals of Oncology*, Volume 34, Issue 4, 2023, Pages 339-357.
92. Ferro A, Marinato GM, Mulargiu C, Marino M, Pasello G, Guarneri V, Bonanno L. The study of primary and acquired resistance to first-line osimertinib to improve the outcome of EGFR-mutated advanced Non-small cell lung cancer patients: the challenge is open for new therapeutic strategies. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2024 Apr;196:104295. Hendriks LE, Kerr KM, Menis J, Mok TS, Nestle U, Passaro A, Peters S, Planchard D, Smit EF, Solomon BJ, Veronesi G, Reck M; ESMO Guidelines Committee. Electronic address: clinicalguidelines@esmo.org. Non-oncogene-addicted metastatic non-small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2023 Apr;34(4):358-376.

93. Gijtenbeek RG, de Jong K, Venmans BJ, van Vollenhoven FH, Ten Brinke A, Van der Wekken AJ, van Geffen WH. Best first-line therapy for people with advanced non-small cell lung cancer, performance status 2 without a targetable mutation or with an unknown mutation status. *Cochrane Database Syst Rev.* 2023 Jul 7;7(7):CD013382.
94. Nikanjam M, Kato S, Kurzrock R. Liquid biopsy: current technology and clinical applications. *J Hematol Oncol.* 2022 Sep 12;15(1):131.
95. Li W, Liu JB, Hou LK, Yu F, Zhang J, Wu W, Tang XM, Sun F, Lu HM, Deng J, Bai J, Li J, Wu CY, Lin QL, Lv ZW, Wang GR, Jiang GX, Ma YS, Fu D. Liquid biopsy in lung cancer: significance in diagnostics, prediction, and treatment monitoring. *Mol Cancer.* 2022 Jan 20;21(1):25.
96. Rolfo C, Mack P, Scagliotti GV, Aggarwal C, Arcila ME, Barlesi F, Bivona T, Diehn M, Dive C, Dziadziuszko R, Leighl N, Malapelle U, Mok T, Peled N, Raez LE, Sequist L, Sholl L, Swanton C, Abbosh C, Tan D, Wakelee H, Wistuba I, Bunn R, Freeman-Daily J, Wynes M, Belani C, Mitsudomi T, Gandara D. Liquid Biopsy for Advanced NSCLC: A Consensus Statement From the International Association for the Study of Lung Cancer. *J Thorac Oncol.* 2021 Oct;16(10):1647-1662.
97. Zulato E, Del Bianco P, Nardo G, Attili I, Pavan A, Boscolo Bragadin A, Marra L, Pasello G, Fassan M, Calabrese F, Guarneri V, Conte PF, Indraccolo S, Bonanno L.. Longitudinal liquid biopsy anticipates hyperprogression and

early death in advanced non-small cell lung cancer patients treated with immune checkpoint inhibitors. *Br J Cancer*. 2022 Nov;127(11):2034-2042.

98. Zulato E, Attili I, Pavan A, Nardo G, Del Bianco P, Boscolo Bragadin A, Verza M, Pasqualini L, Pasello G, Fassan M, Calabrese F, Guarneri V, Amadori A, Conte P, Indraccolo S, Bonanno L. Early assessment of KRAS mutation in cfDNA correlates with risk of progression and death in advanced non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer*. 2020 Jul;123(1):81-9.

99. Bonanno L, Dal Maso A, Pavan A, Zulato E, Calvetti L, Pasello G, Guarneri V, Conte P, Indraccolo S. Liquid biopsy and non-small cell lung cancer: are we looking at the tip of the iceberg? *Br J Cancer*. 2022 Aug;127(3):383-393.

100. Casagrande GMS, Silva MO, Reis RM, Leal LF. Liquid Biopsy for Lung Cancer: Up-to-Date and Perspectives for Screening Programs. *Int J Mol Sci*. 2023 Jan 28;24(3):2505.

101. Kim T, Kim EY, Lee SH, Kwon DS, Kim A, Chang YS. Presence of mEGFR ctDNA predicts a poor clinical outcome in lung adenocarcinoma. *Thorac Cancer*. 2019 Dec;10(12):2267-2273.

102. Blaquier JB, Ortiz-Cuaran S, Ricciuti B, Mezquita L, Cardona AF, Recondo G. Tackling Osimertinib Resistance in EGFR-Mutant Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res*. 2023 Sep 15;29(18):3579-3591.

103. Schwartz LH, Litière S, de Vries E, Ford R, Gwyther S, Mandrekar S, Shankar L, Bogaerts J, Chen A, Dancey J, Hayes W, Hodi FS, Hoekstra OS, Huang EP, Lin N, Liu Y, Therasse P, Wolchok JD, Seymour L. RECIST 1.1-Update and clarification: From the RECIST committee. *Eur J Cancer*. 2016 Jul;62:132-7.
104. Blaquier JB, Ortiz-Cuaran S, Ricciuti B, Mezquita L, Cardona AF, Recondo G. Tackling Osimertinib Resistance in EGFR-Mutant Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res*. 2023 Sep 15;29(18):3579-3591.
105. Zhou S, Huang R, Cao Y. Detection of epidermal growth factor receptor mutations in peripheral blood circulating tumor DNA in patients with advanced non-small cell lung cancer: A PRISMA-compliant meta-analysis and systematic review. *Medicine (Baltimore)*. 2020 Oct 2;99(40):e21965.
106. Lee JY, Qing X, Xiumin W, Yali B, Chi S, Bak SH, et al. Longitudinal monitoring of EGFR mutations in plasma predicts outcomes of NSCLC patients treated with EGFR TKIs: Korean Lung Cancer Consortium (KLCC-12-02) *Oncotarget*. 2016;7:6984–93.
107. Lorenzi M, Ferro A, Cecere F, Scattolin D, Del Conte A, Follador A, Pilotto S, Polo V, Santarpia M, Chiari R, Pavan A, Dal Maso A, Da Ros V, Targato G, Vari S, Indraccolo S, Calabrese F, Frega S, Bonanno L, Conte PF, Guarneri

V, Pasello G. First-Line Osimertinib in Patients with EGFR-Mutant Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: Outcome and Safety in the Real World: FLOWER Study. *Oncologist*. 2022 Mar 4;27(2):87-e115.

108. Li WQ, Cui JW. Non-small cell lung cancer patients with ex19del or exon 21 L858R mutation: distinct mechanisms, different efficacies to treatments. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2020 Sep;146(9):2329-2338.
109. Thress KS, Markovets A, Barrett JC, Chmielecki J, Goldberg SB, Shepherd FA, et al. Complete clearance of plasma EGFR mutations as a predictor of outcome on osimertinib in the AURA trial. *J Clin Oncol*. 2017;35:9018.
110. Winfree KB, Molife C, Peterson PM, Chen Y, Visseren-Grul CM, Leusch MS, Beyrer J, Dimou A. Real-world characteristics and outcomes of advanced non-small-cell lung cancer patients with *EGFR* exon 19 deletions or exon 21 mutations. *Future Oncol*. 2021 Aug;17(22):2867-2881.
111. Kobayashi Y, Mitsudomi T. Not all epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer are created equal: Perspectives for individualized treatment strategy. *Cancer Sci*. 2016 Sep;107(9):1179-86..
112. Naidoo J, Sima CS, Rodriguez K *et al* Epidermal growth factor receptor exon 20 insertions in advanced lung adenocarcinomas: clinical outcomes and response to erlotinib. *Cancer* 2015; 121: 3212–20.

113. Yang JC, Sequist LV, Geater SL *et al* Clinical activity of afatinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring uncommon EGFR mutations: a combined post-hoc analysis of LUX-Lung 2, LUX-Lung 3, and LUX-Lung 6. *Lancet Oncol* 2015; 16: 830–8.
114. Li WQ, Cui JW. Non-small cell lung cancer patients with ex19del or exon 21 L858R mutation: distinct mechanisms, different efficacies to treatments. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2020 Sep;146(9):2329-2338.
115. Lee JY, Qing X, Xiumin W, Yali B, Chi S, Bak SH, et al. Longitudinal monitoring of EGFR mutations in plasma predicts outcomes of NSCLC patients treated with EGFR TKIs: Korean Lung Cancer Consortium (KLCC-12-02) *Oncotarget*. 2016;7:6984–93.
116. Zhou C, Imamura F, Cheng Y, Okamoto I, Cho BC, Lin MC, et al. Early clearance of plasma EGFR mutations as a predictor of response to osimertinib and comparator EGFR-TKIs in the FLAURA trial. *J Clin Oncol*. 2019;37:9020.
117. Thress KS, Markovets A, Barrett JC, Chmielecki J, Goldberg SB, Shepherd FA, et al. Complete clearance of plasma EGFR mutations as a predictor of outcome on osimertinib in the AURA trial. *J Clin Oncol*. 2017;35:9018.
118. Nishio M, Paz-Ares L, Reck M, Nakagawa K, Garon EB, Popat S, Ceccarelli M, Graham HT, Visseren-Grul C, Novello S. RELAY, Ramucirumab

Plus Erlotinib (RAM+ERL) in Untreated Metastatic EGFR-Mutant NSCLC (EGFR+ NSCLC): Association Between TP53 Status and Clinical Outcome. *Clin Lung Cancer*. 2023 Jul;24(5):415-428.

119. Canale M, Petracci E, Delmonte A, Bronte G, Chiadini E, Ludovini V, Dubini A, Papi M, Baglivo S, De Luigi N, Verlicchi A, Chiari R, Landi L, Metro G, Burgio MA, Crinò L, Ulivi P. Concomitant *TP53* Mutation Confers Worse Prognosis in *EGFR*-Mutated Non-Small Cell Lung Cancer Patients Treated with TKIs. *J Clin Med*. 2020 Apr 7;9(4):1047.
120. Kim Y, Lee B, Shim JH, Lee SH, Park WY, Choi YL, Sun JM, Ahn JS, Ahn MJ, Park K. Concurrent Genetic Alterations Predict the Progression to Target Therapy in *EGFR*-Mutated Advanced NSCLC. *J Thorac Oncol*. 2019 Feb;14(2):193-202.
121. Zhang Z, Xue J, Yang Y, Fang W, Huang Y, Zhao S, Luo F, Cao J, Zeng K, Ma W, Zhan J, Lu F, Zhang L, Zhao H. Influence of TP53 mutation on efficacy and survival in advanced EGFR-mutant non-small cell lung cancer patients treated with third-generation EGFR tyrosine kinase inhibitors. *MedComm* (2020). 2024 Jun 2;5(6):e586.
122. Passaro A, Wang J, Wang Y, Lee SH, Melosky B, Shih JY, Wang J, Azuma K, Juan-Vidal O, Cobo M, Felip E, Girard N, Cortot AB, Califano R, Cappuzzo F, Owen S, Popat S, Tan JL, Salinas J, Tomasini P, Gentzler RD, William WN Jr, Reckamp KL, Takahashi T, Ganguly S, Kowalski DM, Bearz A, MacKean

- M, Barala P, Bourla AB, Girvin A, Greger J, Millington D, Withelder M, Xie J, Sun T, Shah S, Diorio B, Knoblauch RE, Bauml JM, Campelo RG, Cho BC; MARIPOSA-2 Investigators. Amivantamab plus chemotherapy with and without lazertinib in EGFR-mutant advanced NSCLC after disease progression on osimertinib: primary results from the phase III MARIPOSA-2 study. *Ann Oncol.* 2024 Jan;35(1):77-90.
123. Planchard D, Jänne PA, Cheng Y, Yang JC, Yanagitani N, Kim SW, Sugawara S, Yu Y, Fan Y, Geater SL, Laktionov K, Lee CK, Valdiviezo N, Ahmed S, Maurel JM, Andrasina I, Goldman J, Ghiorghiu D, Rukazenzov Y, Todd A, Kobayashi K; FLAURA2 Investigators. Osimertinib with or without Chemotherapy in *EGFR*-Mutated Advanced NSCLC. *N Engl J Med.* 2023 Nov 23;389(21):1935-1948.