

1222 • 2022  
**800**  
ANNI



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**  
**CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN MEDICINA E**  
**CHIRURGIA**

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIRURGICHE, ONCOLOGICHE E  
GASTROENTEROLOGICHE

Direttore: Ch.mo Prof. Fabio Farinati

UOC ONCOLOGIA 2 – ISTITUTO ONCOLOGICO VENETO I.R.C.C.S.

Direttore: Prof.ssa Valentina Guarneri

**TESI DI LAUREA**

**Studio osservazionale retrospettivo sull’impatto del  
sequenziamento di nuova generazione (NGS) nel percorso  
diagnostico-terapeutico di pazienti affetti da tumore del  
polmone non a piccole cellule**

RELATRICE: Prof.ssa Giulia Pasello

CORRELATORE: Dott. Alessandro Dal Maso

LAUREANDA: Sara Broggiato

ANNO ACCADEMICO 2021/2022



# INDICE

## RIASSUNTO – ABSTRACT

<b>INTRODUZIONE</b> .....	<b>pag.9</b>
<b>Epidemiologia</b> .....	<b>pag.9</b>
<b>Eziopatogenesi</b> .....	<b>pag.10</b>
<b>Diagnosi del NSCLC</b> .....	<b>pag.12</b>
<b>Presentazione clinica</b> .....	<b>pag.12</b>
<b>Imaging</b> .....	<b>pag.14</b>
<b>Biopsia tissutale</b> .....	<b>pag.15</b>
<b>Caratterizzazione istologica</b> .....	<b>pag.17</b>
<b>Caratterizzazione molecolare</b> .....	<b>pag.19</b>
<b>Biopsia liquida</b> .....	<b>pag.25</b>
<b>Analisi NGS</b> .....	<b>pag.27</b>
<b>Stadiazione</b> .....	<b>pag.32</b>
<b>Terapia e prognosi del NSCLC</b> .....	<b>pag.36</b>
<b>Terapia della malattia in stadio precoce</b> .....	<b>pag.36</b>
<b>Terapia della malattia localmente avanzata</b> .....	<b>pag.39</b>
<b>Terapia della malattia avanzata</b> .....	<b>pag.41</b>
<b>OBBIETTIVO DELLO STUDIO</b> .....	<b>pag.51</b>
<b>MATERIALI E METODI</b> .....	<b>pag.53</b>
<b>Popolazione di pazienti</b> .....	<b>pag.53</b>
<b>Pannelli NGS</b> .....	<b>pag.55</b>

<b>Analisi statistica .....</b>	<b>pag.57</b>
<b>RISULTATI.....</b>	<b>pag.61</b>
<b>Caratteristiche cliniche e patologiche dei pazienti .....</b>	<b>pag.61</b>
<b>Prima analisi NGS .....</b>	<b>pag.63</b>
<b>Iter diagnostico .....</b>	<b>pag.65</b>
<b>Iter terapeutico .....</b>	<b>pag.68</b>
<b>Seconda analisi NGS .....</b>	<b>pag.71</b>
<b>NGS sincroni .....</b>	<b>pag.71</b>
<b>Iter diagnostico NGS metacroni.....</b>	<b>pag.72</b>
<b>Iter terapeutico NGS metacroni.....</b>	<b>pag.75</b>
<b>DISCUSSIONE.....</b>	<b>pag.81</b>
<b>CONCLUSIONI.....</b>	<b>pag.87</b>
<b>Bibliografia .....</b>	<b>pag.89</b>

## RIASSUNTO

**Presupposti dello studio:** nell'ultimo decennio, diagnosi e terapia del NSCLC si sono basati molto sui biomarkers e la caratterizzazione molecolare tramite Next Generation Sequencing (NGS) ha permesso lo screening contemporaneo di molte alterazioni genetiche *druggable* sia su campioni tissutali che su biopsie liquide, con un significativo passo in avanti nell'ambito della medicina personalizzata.

**Obiettivo dello studio:** descrivere tempistica ed indicazione clinica all'esecuzione dell'analisi NGS nella reale pratica clinica e scelta del campione biologico su cui effettuare il test. Questo studio ha voluto anche valutare l'impatto sulla scelta terapeutica derivato dal risultato del test NGS e descrivendo l'esito di tale scelta terapeutica sulla sopravvivenza dei pazienti oggetto di studio.

**Materiali e metodi:** sono stati studiati retrospettivamente pazienti con NSCLC avanzato in trattamento presso lo IOV, che hanno eseguito la caratterizzazione molecolare tramite almeno un test NGS tra dicembre 2017 e luglio 2022. Sono stati raccolti i dati inerenti alle caratteristiche cliniche dei pazienti e alla loro caratterizzazione molecolare al basale prima del test NGS. Durante il periodo di analisi sono state valutate le modalità di accesso al test, la tipologia di biopsia usata, le tempistiche di elaborazione, i risultati dei test in termini di presenza di alterazioni molecolari *druggable* e il relativo accesso alla terapia target. L'impatto clinico del test è stato valutato descrivendo l'impatto dell'accesso alle terapie target sull'outcome in termini di sopravvivenza libera da progressione di malattia (PFS) e sopravvivenza globale (OS).

**Risultati:** 153 pazienti sono stati sottoposti a un test NGS, di cui 42 (27.44%) ne hanno eseguito anche un secondo (di cui 9 pazienti hanno ricevuto i due test in sincronia su plasma e tessuto). I pazienti che hanno avuto accesso al primo test tramite protocollo di studio hanno ricevuto il referto venti giorni prima rispetto ai pazienti della pratica clinica. Sono stati individuati 35/153 (22.87%) pazienti con alterazioni *druggable*, di cui 13 (8.5%) hanno avuto accesso alla terapia target. Per i 9 (5.88%) pazienti che hanno eseguito il secondo sequenziamento in sincronia al primo, si è registrata una correlazione significativa tra i risultati dei due test ( $p=0.0289$ ). Per i 33 (21.56%) pazienti che hanno avuto accesso al secondo NGS

metacrono, la differenza in termini di tempi d'attesa tra prima visita e refertazione in base alla modalità di accesso al test è stata leggermente meno marcata (18.5 giorni,  $p=0.002$ ), rispetto alla differenza di tempi registrata al primo test (20 giorni,  $p<0.001$ ). Al secondo test sono stati individuati 12/33 (36.36%) pazienti con alterazioni *druggable*, di cui 6 (18.18%) hanno avuto accesso alla terapia target. Per i 37 (24.18%) pazienti che hanno avuto accesso a una terapia a bersaglio molecolare a seguito di qualsiasi test molecolare si è registrata una mOS significativamente migliore (17 mesi), rispetto ai pazienti che non avevano mai ricevuto un farmaco mirato (7.4 mesi,  $p<0.001$ ). Per quanto riguarda i 15 (9.8%) pazienti che hanno ricevuto una terapia mirata solo successivamente al test NGS, anche in questo caso si è vista una sopravvivenza significativamente migliore (16 mesi), rispetto a coloro che non hanno mai potuto accedere a un approccio mirato (7.4 mesi,  $p=0.033$ ). La PFS mediana dei 19 pazienti che hanno ricevuto una target therapy in seguito ad analisi con pannello NGS era 9.4 mesi.

**Conclusioni:** nel presente studio retrospettivo abbiamo descritto l'utilizzo di diverse tipologie di pannelli NGS all'interno dell'Istituto Oncologico Veneto, nella pratica clinica e all'interno di trial clinici. L'esecuzione di questo test alla diagnosi della malattia potrebbe essere più vantaggiosa per il paziente. Inoltre, potrebbe essere utile l'esecuzione (anche contemporanea) dell'analisi NGS oltre che su campione solido, anche su biopsia liquida. Le tempistiche con cui vengono svolte le analisi nella pratica clinica potrebbero essere ulteriormente migliorate, ottimizzando gli algoritmi diagnostici disponibili nella pratica clinica. Infine, si rimarca l'efficacia delle terapie target, per cui dovrebbe essere incoraggiato l'utilizzo di ampi pannelli NGS, per una tempestiva e adeguata caratterizzazione molecolare della malattia oncologica.

## ABSTRACT

**Background:** over the course of the last decade, the diagnosis and treatment of NSCLC have been based on the usage of biomarkers. Molecular characterization through Next Generation Sequencing (NGS) has made it possible for the screening of many druggable genetic alterations to be performed simultaneously both in tissue samples and in liquid biopsies. This has afforded significant progress in the field of personalized medicine.

**Aim of the study:** describing the timing and the clinical indication for carrying out the NGS analysis in real clinical practice, as well as the selection of the biological sample to perform the test upon. This study also aimed at evaluating the impact of the NGS test results on the therapeutic choice and at describing the impact of this therapeutic choice on the survival of the patients under study.

**Methods:** we retrospectively reviewed data from NSCLC patients receiving treatment in *Istituto Oncologico Veneto* (IOV), who underwent molecular characterization through at least one NGS test between December 2017 and July 2022. Data on the patients' clinical features and their baseline molecular characterization were collected before the administration of the NGS test. During the analysis period, we evaluated the means of access to the test, the type of biopsy which was used, the processing times, the test results (with respect to the presence of druggable molecular alterations) and the relative access to the target therapy. The clinical impact of the test was assessed by describing the impact of the access to target therapies on the outcome in terms of progression-free survival (PFS) and overall survival (OS).

**Results:** 153 patients underwent a first NGS test; 42 (27.44%) of these patients also went through a second one (among these, 9 patients received it in synchrony both on plasma and tissue). Patients who had access to the first test via study protocol received the report twenty days earlier than patients in clinical practice. Druggable alterations were detected in 35/153 (22.87%) patients, among whom 13 (8.5%) had access to target therapy. For the 9 (5.88%) patients who went through the second sequencing in synchrony with the first, a significant correlation between the results of the two tests was found ( $p=0.0289$ ). As for the 33 (21.56%) patients who had had access to the second NGS in metacrony, the difference depending on the type

of access was slightly less evident (18.5 days,  $p=0.002$ ) compared to the first test (20 days,  $p<0.001$ ). During the second test, *druggable* alterations were detected in 12/33 (36.36%) patients, among whom 6 (18.18%) had access to the target therapy. The 37/153 (24.18%) patients who had had access to target therapy following any molecular test showed a significantly improved mOS (17 months), in comparison to patients who had never received a targeted drug (7.4 months,  $p<0.001$ ). As for the 15 (9.8%) patients who had received the target therapy only after the NGS test, the survival outcome was once again better (16 months), if compared to those who had never had access to a targeted approach (7.4 months,  $p=0.033$ ). In the end, the median PFS of the 19 patients who received target therapy following NGS panel analyses was 9.4 months.

**Conclusions:** in this retrospective study, we described the use of different types of NGS panels in the *Istituto Oncologico Veneto* (IOV), in clinical practice and in cynical trials. Performing this test when the disease is diagnosed could be more beneficial for the patient. Furthermore, it may be useful to perform the NGS analysis both on solid samples and on liquid biopsy (even simultaneously). The timing with which analyses are carried out in clinical practice could be further improved by optimizing the diagnostic algorithms available in clinical practice. In conclusion, the positive impact of target therapies ought to be underlined; due to this, the use of large NGS panels should be encouraged in order to grant a rapid and adequate molecular characterization of the oncological disease.



# INTRODUZIONE

## 1. Epidemiologia

Il tumore del polmone è una patologia oncologica con una forte rilevanza epidemiologica: in Italia nel 2020 si sono registrate 41.000 nuove diagnosi (27.550 negli uomini e 13.300 nelle donne). Si tratta infatti, della seconda neoplasia più frequente nel sesso maschile (15%), dopo il tumore alla prostata, e la terza più frequente in quello femminile (6%), dopo tumore della mammella e del colon-retto (1). Negli ultimi 30 anni si è assistito a un differente trend d'incidenza tra i due sessi: negli uomini si è visto un calo dell'incidenza e mortalità per questo tumore, mentre nelle donne si sono visti dati opposti. Questo sembrerebbe principalmente legato al fatto che l'abitudine tabagica tra le donne ha iniziato a diffondersi a partire dagli anni '80, portando a un aumento dei casi in questa popolazione (2) (**Figure 1 e 2**).

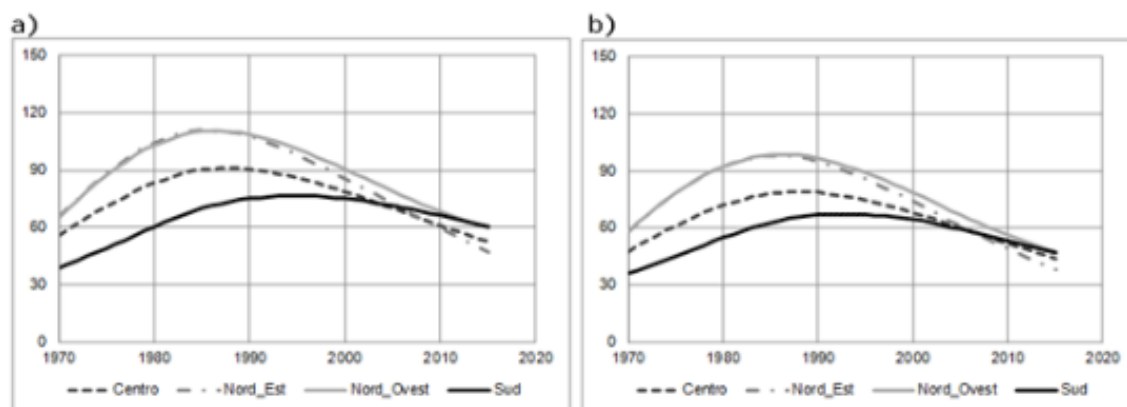


Figura 1. Incidenza (a) e mortalità (b) per tumore del polmone dal 1970 al 2015 negli uomini in UE; Epicentro ISS; 2022

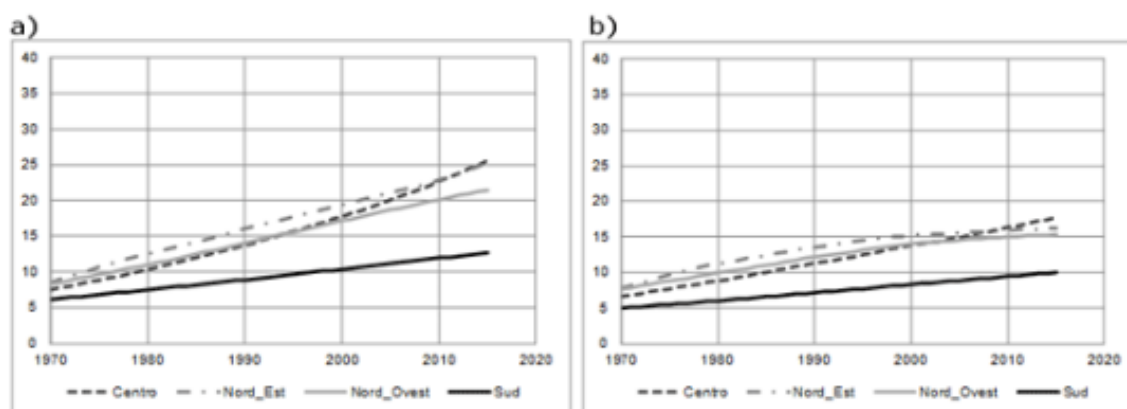


Figura 2. Incidenza (a) e mortalità (b) per tumore al polmone dal 1970 al 2015 nelle donne in UE; Epicentro ISS; 2022

Le fasce d'età più colpite da questa malattia sono quelle sopra i 50 anni, con un picco di diagnosi intorno ai 70 anni. Inoltre, in Italia si può notare una diversa distribuzione geografica delle incidenze: la neoplasia polmonare è più frequente al nord (105 casi per 100.000 abitanti), mentre al centro-sud e nelle isole si registrano valori leggermente più bassi (102 casi per 100.000 abitanti) (2).

Oltre a essere una neoplasia frequente, il tumore polmonare presenta un'importante mortalità ed è infatti la prima causa oncologica di morte a livello globale (3). In Italia è la prima causa di morte per tumore tra gli uomini e la seconda nelle donne (2). Nel 2021 nel nostro paese sono stati stimati 34.000 decessi per tumore al polmone (23.100 negli uomini e 10.900 nelle donne) (1).

Per quanto riguarda la sopravvivenza, la percentuale di pazienti vivi a 5 anni dalla diagnosi oscilla tra il 16% e il 23% a seconda del sesso (2). Inoltre, la bassa sopravvivenza è anche dovuta al fatto che la maggior parte dei pazienti arriva a una diagnosi di certezza in stadio ormai avanzato, per cui le opzioni terapeutiche con intento curativo sono assenti o limitate.

## **2. Eziopatogenesi**

L'elevata incidenza del tumore polmonare e le statistiche di mortalità legate a esso, sottolineano l'importanza della prevenzione primaria e in particolar modo della lotta contro il fumo, principale fattore di rischio per lo sviluppo di questa malattia. Il fumo di sigaretta è responsabile dell'85-90% dei casi osservati nel nostro Paese (2), oltre a essere un importante fattore di rischio anche per altre neoplasie e malattie. È noto che il rischio relativo di sviluppare un tumore al polmone nei fumatori di sigarette è di quattro volte maggiore rispetto ai non-fumatori e arriva a dieci volte nei forti fumatori (più di venti sigarette al giorno) (4). Il rischio relativo è legato anche ad alcuni fattori specifici fra cui: il numero di sigarette fumate al giorno, la durata in anni dell'abitudine tabagica e il contenuto di catrame delle sigarette. Anche l'esposizione al fumo passivo rappresenta un fattore di rischio: diversi studi evidenziano per i fumatori passivi una percentuale di rischio di sviluppare questo tumore tra il 20% e il 50%, rispetto ai non fumatori (2). Secondo uno studio dell'Istituto BVA Doxa condotto per la Lega Italiana per la Lotta contro i Tumori, dal 2017 al 2021 l'abitudine al fumo non è variata, anzi c'è stato un

aumento del numero di “*baby-fumatori*”, un aumento del consumo giornaliero di sigarette tra i giovani e un dimezzamento dell’intenzione a smettere di fumare, forse legato anche a uno stato d’insofferenza dopo le restrizioni della pandemia negli ultimi due anni (5). Anche il fumo di pipa e di sigaro aumentano le possibilità di ammalarsi di tumore al polmone. Per quanto riguarda, invece, le sigarette elettroniche (“*e-cigarette*”) i dati non sono ancora completamente concordi sul rischio di sviluppare la malattia oncologica, ma si pensa che possano avere un effetto simile al fumo di sigaretta nel regolare dei patterns di espressione genetica nelle cellule epiteliali bronchiali umane (4). Smettendo di fumare il rischio di sviluppare il cancro al polmone si riduce progressivamente nei successivi 10-15 anni, con importante vantaggio in termini di anni di vita guadagnati soprattutto per chi smette entro i 40 anni d’età (2).

Molte altre sostanze di origine lavorativa e/o ambientale sono riconosciute come cancerogeni polmonari e in alcuni casi, come per l’amianto e il radon, possono avere un effetto sinergico con il fumo di sigaretta (4).

Tra gli altri fattori di rischio per il tumore al polmone vi sono anche i combustibili ricavati da biomassa usati in ambito domestico, perché contengono diversi composti cancerogeni, tra cui il benzene e altri idrocarburi policiclici aromatici. In ambiente lavorativo esistono altri composti che possono favorire l’insorgenza di neoplasia: l’asbesto, ad esempio, è un noto fattore di rischio per lo sviluppo di tumore polmonare correlato all’occupazione, con un aggiuntivo effetto sinergico nei fumatori (4). Altre sostanze pericolose nella lunga esposizione sono: anidride arseniosa, benzopirene, berillio, cadmio, clorometano, cromo, metilene, nichel, radon, silice, uranio o altre polveri di metalli pesanti e molti altri prodotti industriali che, come l’amianto, possono agire in sinergia con il fumo di tabacco (4, 6). Anche l’inquinamento atmosferico è uno dei fattori più strettamente connessi allo sviluppo di tumore polmonare: si registra, infatti, una maggiore incidenza di malattia nelle aree urbane industrializzate, dove c’è una maggior concentrazione di polveri sottili (2, 4, 6, 59).

Correlata, da un lato al fumo di sigaretta e dall’altro al tumore polmonare, vi è la bronco-pneumopatia cronica ostruttiva (BPCO): circa il 25% dei fumatori sviluppano la BPCO e il 10-15% di questi sviluppano poi la neoplasia al polmone. Secondo alcuni studi anche soggetti che non hanno mai fumato, ma che presentano

una storia di bronchiti croniche, TBC o polmoniti hanno un maggior rischio di malattia oncologica (6, 58).

Per quanto nell'eziologia del tumore al polmone rimanga prevalente il peso dei fattori ambientali, negli ultimi anni alcuni studi avrebbero individuato dei polimorfismi nel DNA, che sembrano dare una certa predisposizione genetica (2). Inoltre, si è visto che parenti di primo grado di pazienti con tumore al polmone hanno anch'essi un maggior rischio di svilupparlo, indipendentemente dalle abitudini tabagiche. Secondo alcuni studi, anche fattori come il sesso femminile (per varianti geniche, esposizione ambientale e fattori ormonali) e l'etnia afroamericana (sempre per motivi di predisposizione genetica) rappresenterebbero dei fattori di rischio per lo sviluppo di tumore al polmone, con forme di malattie a prognosi più grave (4,7).

### **3. Diagnosi del NSCLC**

Il sospetto di tumore polmonare può nascere da un quadro clinico oppure da un'indagine radiologica, solitamente radiografica, effettuata per altri motivi. In entrambi i casi si deve subito procedere alla raccolta di una dettagliata storia anamnestica (abitudine tabagica, comorbilità, perdita di peso, performance status, familiarità per neoplasie, etc.) e a un esame obiettivo completo del paziente.

#### **3.1 Presentazione clinica**

La mancanza di sintomi manifesti e specifici è la principale causa per cui l'80% dei pazienti arriva alla diagnosi di tumore polmonare già in uno stadio avanzato (9). La diagnosi precoce di questa neoplasia è infatti fondamentale e diverse organizzazioni sanitarie nazionali stanno cercando di sviluppare dei protocolli di screening, basati sulla LDCT (Low Dose Computed Tomography), per le popolazioni più a rischio, come fumatori e lavoratori esposti a cancerogeni polmonari. In questo ambito però non si è ancora raggiunto un unico accordo sui criteri e metodi da utilizzare, per selezionare e indagare questi soggetti. I risultati in termini di riduzione della mortalità sono comunque incoraggianti supportando questo campo di ricerca (13-15).

Segni e sintomi del tumore polmonare possono variare a seconda dell'istotipo e alla presenza e localizzazione delle metastasi (20). Come accennato prima le manifestazioni cliniche sono spesso tardive e subdolamente silenti, con numerosi casi di lesioni di dimensioni già notevoli o la presenza di malattia a distanza. Inoltre, nel 10-15% dei casi la diagnosi è casuale nel corso di accertamenti clinici attuati per altri motivi (6). L'esame obiettivo del torace del paziente può essere del tutto negativo, soprattutto se la lesione si localizza in profondità: a volte si può rilevare un'area circoscritta d'ipofonesi percussoria, eventualmente associata a ronchi e sibili nel caso in cui la lesione comprima i bronchi o abbia direttamente una crescita endoluminale.

Tra i sintomi più comuni vi è sicuramente la tosse, tipica delle lesioni localizzate in prossimità della biforcazione tracheale o che si sviluppano nelle prime ramificazioni delle vie aeree. Questa tosse, conseguente all'irritazione bronchiale, è tipicamente stizzosa e non produttiva, ad eccezione del carcinoma bronchiolo alveolare che può produrre una grande quantità di secreto mucoso ad alta viscosità. Tra i segni tipici della presenza di tumore polmonare va ricordata la presenza di sangue nell'espettorato, anche se spesso tardivo: si parla di emoftoe, quando questo è presente in piccole quantità tali da macchiare l'escreato, mentre si parla di emottisi quando si ha una maggior quantità di sangue proveniente dalle vie respiratorie. Entrambi questi segni sono una "*red flag*" per la presenza di neoplasia broncogena fino a prova contraria. Un'evenienza comune è quella dell'ostruzione del bronco da cui ha avuto origine il tumore, che può portare allo sviluppo di infezioni broncopneumoniche recidivanti e insorgenti sempre nella stessa sede, a valle dell'ostruzione. Se la neoplasia ha una localizzazione più periferica, come nel caso dell'adenocarcinoma, questa può accrescersi e invadere le strutture contigue al polmone. L'interessamento del cavo pleurico ha come tipico risultato lo sviluppo di versamento pleurico, spesso emorragico. L'insorgenza di un'intensa sintomatologia dolorosa, invece, può essere indicativa di un'estensione della neoplasia alla parete toracica con compressione o irritazione dei fasci nervosi sensitivi. Nel caso in cui il tumore polmonare si localizzi e cresca a livello dell'apice polmonare, può andare a interessare il plesso brachiale, le coste e le vertebre cervicali, dando origine alla sindrome di Pancoast con disturbi motori e sensitivo-dolorosi all'arto superiore omolaterale (16). Se vi è anche un contemporaneo interessamento del ganglio cervicale inferiore del sistema simpatico, la sindrome

prende il nome di Claude-Bernard-Horner e si manifesterà con miosi pupillare, enoftalmo, ptosi palpebrale e anidrosi omolaterali (17). Nel caso in cui il tumore si sviluppi più centralmente al torace, può andare a invadere diverse strutture nel mediastino, tra cui il nervo frenico, il nervo laringeo, l'esofago, il pericardio e le fibre nervose del miocardio o la vena cava superiore. In quest'ultima situazione, nota anche come sindrome della vena cava superiore, si avrà lo sviluppo del caratteristico edema a mantellina con turgore dei vasi venosi del collo e formazione di circoli collaterali, che permettono il drenaggio dei territori a monte dell'ostruzione (18).

Oltre alle manifestazioni legate alla localizzazione polmonare della neoplasia, vi sono anche dei sintomi e segni costituzionali aspecifici, presenti anche in altri quadri tumorali maligni, e le manifestazioni legate alla presenza delle metastasi.

Infine, esiste un eterogeneo gruppo di disturbi detti sindromi paraneoplastiche. Queste sono solitamente dovute alla produzione ectopica di sostanze ad azione endocrina (ACTH, ADH, PTH, EPO, PRL, serotonina) con lo sviluppo dei relativi quadri sindromici (sindrome di Cushing, diabete insipido, iperparatiroidismo con ipercalcemia, poliglobulia, galattorrea e/o ginecomastia e sindrome da carcinoide). Tra le sindromi paraneoplastiche senza produzione di sostanze biologicamente attive legate al tumore polmonare, ma anche ad altre patologie respiratorie, vi è l'ippocratismo digitale, una particolare alterazione morfologica delle ultime falangi delle dita di mani e piedi (19).

## **3.2 Imaging**

Tra le indagini radiologiche, il primo step è sempre rappresentato dalla radiografia (RX) del torace nelle proiezioni standard, confrontata con eventuali RX precedenti, seguita da una tomografia computerizzata (TC) con mezzo di contrasto iodato. La TC è la miglior tecnica per rilevare noduli e neoplasie polmonari, dando informazioni dettagliate sulla localizzazione e dimensione della massa (11). La TC dev'essere estesa al torace, all'addome superiore e alla regione cervicale inferiore, in modo da poter identificare eventuali secondarismi a fegato, surreni e linfonodi sovraclaveari. Pur in assenza di sintomi neurologici, può essere consigliata

l'inclusione di una TC dell'encefalo nelle istologie non squamose e/o nei casi in cui la stadiazione non evidenzi una malattia al primo stadio.

Nel caso in cui la TC non mostri in prima istanza la presenza di metastasi a distanza, la stadiazione dev'essere completata con la tomografia a emissione di positroni con desossiglucosio marcato con 18-fluoro combinata alla TC (<sup>18</sup>F-FDG PET-TC) per confermare l'assenza di malattia a livello dei linfonodi mediastinici e di metastasi a distanza occulte (21, 22). La PET-TC permette, infatti, una stadiazione più accurata del tumore polmonare rispetto alla TC, grazie alla sua maggiore sensibilità nell'identificare metastasi extratoraciche ed ossee. In relazione alla stadiazione linfonodale, la PET ha un elevato valore predittivo negativo, per cui non è indicato svolgere altri esami biotici invasivi in presenza di linfonodi mediastinici metabolicamente negativi in pazienti con malattia localizzata. In caso di captazione a livello mediastinico, invece, è indicato un approfondimento istologico per escludere eventuali falsi positivi (21).

Altro esame radiologico disponibile è la risonanza magnetica nucleare (RMN) con mezzo di contrasto con gadolinio, esame elettivo per indagare la presenza di metastasi nel sistema nervoso centrale, richiesto come approfondimento in caso di lesioni dubbie o visibili alla TC con mezzo di contrasto, o in presenza di sintomatologia neurologica o in pazienti in stadi dal II al IV che siano candidati a un trattamento a scopo curativo. La RMN può essere utile anche per valutare alcune lesioni epatiche e ossee, in caso di dubbio alla TC.

### **3.3 Biopsia tissutale**

Il secondo livello diagnostico, dopo la valutazione radiologica, consiste nella caratterizzazione istologica o citologica, elemento chiave per la diagnosi oncologica e per le successive decisioni terapeutiche (12). Ad oggi questo passaggio viene fatto soprattutto tramite il prelievo di tessuto neoplastico, quindi con l'esecuzione di biopsie "solide", con la criticità che molti pazienti affetti da neoplasia polmonare si presentano con una malattia già in stadio avanzato, per cui non è possibile ottenere un campione da resezione chirurgica. Il tessuto può, quindi, essere ottenuto tramite prelievi biotici dal tumore primitivo o dalle sue metastasi linfonodali o a distanza, scegliendo la sede e la tecnica che permetta il miglior

prelievo tissutale/citologico possibile, ma riducendo al minimo gli effetti collaterali e i rischi delle procedure invasive per il paziente. Le linee guida ESMO suggeriscono come metodi gold standard il prelievo tramite broncoscopia con o senza ecoendoscopia (EBUS) e l'approccio transtoracico percutaneo (TTNA).

La broncoscopia permette di svolgere diversi tipi di prelievo, tra cui il brushing, il lavaggio broncoalveolare e le biopsie bronchiali e transbronchiali. La scelta della tecnica dipende principalmente dalla localizzazione della massa da studiare e dal suo pattern di crescita rispetto alle vie aeree: per una lesione situata nei bronchi principali o in prossimità di essi, verrà scelto l'approccio endoscopico, per lesioni più periferiche sarà più vantaggioso l'approccio transcutaneo. In particolare, nel caso della broncoscopia questa permette sia il prelievo delle lesioni che crescono nella parete o nel lume del bronco, ma grazie all'associazione con l'ecoendoscopia, permette anche il prelievo di lesioni adiacenti ai bronchi stessi. L'associazione con l'EBUS permette una specificità diagnostica del 75-85% nelle grandi lesioni centrali, contro la specificità del 65-88% della broncoscopia da sola.

Per le lesioni lontane dalle vie aeree principali, invece, la TBNA è meno vantaggiosa rispetto alla TTNA TC-guidata, a eccezione di tumori di dimensioni >2 cm a pattern solido e in presenza del “*bronchus sign*” (bronco che alle immagini TC afferisce direttamente alla lesione o è presente nel contesto di essa). Il principale rischio legato all'approccio transcutaneo, però, resta la possibilità di sviluppo di pneumotorace, che sia aggira tra il 17% e il 50% dei casi; altri eventi avversi sono l'emotorace, l'emorragia polmonare e l'embolia gassosa (33).

In presenza di versamento pleurico è indicata la toracocentesi, con significato sia di strumento diagnostico di analisi citologica, ma anche terapeutico palliativo, alleviando i disturbi del paziente dovuti alla compressione polmonare. In caso di esame citologico del versamento negativo, si dovrebbe approfondire il quadro con biopsie pleuriche imaging-guidate o con toracoscopia medica/chirurgica.

Esami più invasivi, come la mediastinoscopia, mediastinotomia e altri approcci chirurgici, vengono presi in considerazione quando le precedenti tecniche non consentono un'accurata diagnosi (3).



I campioni istologici e citologici possono essere spesso poveri di materiale tumorale, per cui è indispensabile un saggio utilizzo del materiale, per svolgere tutte le analisi clinicamente utili per la gestione del paziente.

### 3.4 Caratterizzazione istologica

I più frequenti istotipi di carcinoma polmonare, che coprono il 95% delle casistiche, sono: adenocarcinoma (ADC), carcinoma a cellule squamose (SCC), carcinoma a grandi cellule (CGC) e carcinoma a piccole cellule (*SCLC, Small Cell Lung Cancer*) (8). In particolare, le prime tre varianti vengono riunite sotto il nome di tumore polmonare non a piccole cellule (*NSCLC, Non-Small Cell Lung Cancer*), andando a rappresentare circa l'85% dei casi. La diagnosi viene fatta basandosi sulla valutazione dei convenzionali criteri morfologici, ma anche sulle indagini immunohistochimiche (IHC), fondamentali soprattutto per la distinzione delle forme di NSCLC scarsamente differenziate o NOS. Nei casi in cui, per definire l'istotipo di NSCLC lo studio morfologico non basti, le linee guida consigliano l'esecuzione di un pannello di analisi IHC, valutando il thyroid transcription factor-1 (TTF-1; probabile diagnosi di adenocarcinoma) e il p40 (probabile SCC). Nel caso nessuno dei due precedenti marcatori sia positivo, la diagnosi sarà di NSCLC NAS (Non Altrimenti Specificato). Nelle neoplasie polmonari a morfologia endocrina, invece, i marcatori da usare sono: cromogranina, sinaptofisina e CD56. Le indagini d'immunohistochimica possono essere applicate sia su campioni biotici fissati in formalina, sia su preparati citologici e di grande utilità sono anche gli allestimenti di citoinclusi "*cell-block*", partendo da materiale citologico su versamento o materiale citoaspirato. In particolare, il citoincluso è fondamentale in assenza di un campione biotico e permette di eseguire con maggior facilità e attendibilità le indagini molecolari *in situ* a scopo diagnostico e predittivo. Il campione citologico in striscio o a strato sottile presenta, rispetto al *cell-block*, minori artefatti di fissazione e maggiore lunghezza di frammenti di acidi nucleici (2).

#### 3.4.1 Adenocarcinoma

L'adenocarcinoma è attualmente l'istotipo più frequente di tumore polmonare (oltre il 40% dei casi), soprattutto tra le donne e nei non fumatori, anche se stanno

aumentando le diagnosi anche tra i pazienti fumatori (9). La sua eziologia sembra prevalentemente legata a fattori ambientali, come l'inquinamento, e, secondo alcuni, anche a fattori ormonali e genetici. L'adenocarcinoma predilige una localizzazione periferica ed è spesso associato a fibrosi pleurica e a cicatrici subpleuriche (8). A livello istopatologico si tratta di una neoplasia composta da cellule epiteliali a differenziazione ghiandolare e con produzione di mucine ed è solitamente positivo per l'espressione di TTF-1 e Napsina A (9). L'organizzazione Mondiale della Sanità nella sua classificazione aggiornata al 2021, ne distingue tre principali forme, ciascuno con diversi pattern istologici e gradi di differenziazione: preinvasivo, minimamente invasivo e adenocarcinoma invasivo. Alterazioni molecolari frequenti nell'adenocarcinoma sono le mutazioni di *KRAS*, le mutazioni degli esoni 19 e 21 del gene *EGFR*, le mutazioni di *BRAF*, lo skipping dell'esone 14 del gene *MET*, le traslocazioni dei geni *ALK*, *ROS1* e *RET* (10).

### **3.4.2 Carcinoma squamocellulare**

Il carcinoma a cellule squamose rende conto del 20% dei casi di tumore polmonare non a piccole cellule: in passato era l'istotipo più frequente negli uomini, per una maggior esposizione al fumo di sigaretta, suo principale fattore eziopatogenico (9). Il danno cronico dell'epitelio bronchiale porta a modificazioni dell'epitelio di rivestimento con sviluppo di metaplasia squamosa, la quale può poi evolvere in carcinoma infiltrante. Questo istotipo si localizza soprattutto nelle vie aeree di calibro maggiore, con un accrescimento che può essere anche endobronchiale, con cavitazione frequente e conseguente manifestazione nel paziente di tosse ed emoftoe o emottisi (8). L'aspetto istologico di questo tumore è molto variabile: a dispetto del nome, non sempre è presente cheratinizzazione, mentre possono esserci dei ponti intercellulari nelle forme meglio differenziate. In alcuni casi il fenotipo diviene indistinguibile da quello del carcinoma a grandi cellule o da quello del SCLC, per cui si deve ricorrere alla ricerca di marker immunoistochimici, quali p40 e la citocheratina 5/6 (1). Nella classificazione dell'OMS del 2021 se ne distinguono tre varianti: cheratinizzante, non cheratinizzante e basaloide. Le alterazioni molecolari più comuni dell'adenocarcinoma (e.g. mutazioni di *EGFR*, *BRAF* e *MET* o riarrangiamenti di *ALK* e *ROS1*) possono essere ricercate anche tra

i pazienti che presentano un carcinoma squamocellulare, ma in assenza di una storia di tabagismo, in particolar modo in quelli di giovane età. (10)

### **3.4.3 Carcinoma a grandi cellule**

Questa tipologia è la più rara tra tutti gli NSCLC, rappresentando circa il 3% di tutti i tumori polmonari. La sua diagnosi viene fatta per esclusione, in quanto scarsamente differenziato e senza aspetti di morfologia squamosa o ghiandolare. Alcuni carcinomi a grandi cellule hanno un fenotipo immunoistochimico di tipo neuroendocrino o, talvolta, possono essere positivi alle citocheratine (8).

## **3.5 Caratterizzazione molecolare**

La caratterizzazione molecolare dei tumori è un elemento fondamentale del percorso di diagnosi e cura del paziente, alla luce della possibilità di raccomandare terapie a bersaglio molecolare in popolazioni selezionate per l'espressione di un determinato marcatore, secondo le indicazioni della classificazione ESCAT (*ESMO Scale of Clinical Actionability for Molecular Targets*) dei target molecolari usati in clinica. Le linee guida per tutti i pazienti con NSCLC in stadio localmente avanzato o metastatico raccomandano di completare la diagnosi istologica con la caratterizzazione delle alterazioni dei geni di *EGFR* (Epidermal Growth Factor Receptor), *BRAF* (B-Raf proto-oncogene), *ALK* (Anaplastic Lymphoma Kinase), *ROS-1* (Proto-oncogene tyrosine-protein kinase ROS) e *NTRK* 1, 2 e 3, oltre alla valutazione dei livelli di espressione del PD-L1 (Programmed-Death Ligand 1). La valutazione di questi parametri è fondamentale per la definizione della strategia terapeutica di prima linea nei pazienti con NSCLC avanzato. Inoltre, si consiglia, ove possibile, di estendere la valutazione molecolare anche ai cosiddetti "biomarcatori emergenti" (*RET*, *MET*, *KRAS* e HER-2) per favorire l'accesso dei pazienti alle terapie disponibili in ambito di trial clinici e/o programmi d'uso compassionevole o d'accesso allargato attuati in Italia. Queste mutazioni vengono definite "driver", perché direttamente coinvolte nell'oncogenesi della neoplasia del polmone, e i tumori la cui genesi e progressione dipendono da queste alterazioni molecolari, vengono definiti "oncogene addicted". Generalmente le alterazioni molecolari sono mutuamente esclusive le une con le altre, associate all'istotipo

dell'adenocarcinoma e tipiche soprattutto dei non fumatori o ex fumatori da almeno dieci anni o fumatori lievi; si riscontrano principalmente in pazienti giovani e, nel caso particolare di *EGFR*, in donne e soggetti di origine sud-est asiatica.

Tra le tecniche tradizionalmente utilizzate per l'analisi di queste alterazioni abbiamo la FISH (*Fluorescent In Situ Ibridation*), l'immunoistochimica (IHC), la PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e la RT-PCR (*Real Time-PCR*). La FISH o *Fluorescent In Situ Ibridation* è una tecnica che usa sonde fluorescenti, rilevabili al microscopio a fluorescenza, che si legano solo a particolari sequenze di acidi nucleici, complementari alla sonda stessa. Può identificare precise sequenze di DNA nei cromosomi, ma anche diverse sequenze di RNA (mRNA, lncRNA e miRNA) sia su biopsie liquide che solide. Questa tecnica è affidabile e semplice da eseguire, non richiede la coltura delle cellule da analizzare e può essere eseguita su campione incluso in paraffina o su campione fresco, per una più rapida valutazione. Nell'ambito del tumore polmonare, nonostante l'integrazione di IHC e NGS, la FISH resta una tecnica fondamentale per la conferma della rilevazione dei riarrangiamenti di *ALK* e *ROS1* (50). L'immunoistochimica sfrutta la capacità di particolari anticorpi monoclonali prodotti in laboratorio di riconoscere minime differenze sulle diverse proteine alterate nelle cellule tumorali. La presenza della coppia anticorpo-marker viene visualizzata grazie alla presenza di un fluorocromo o di un enzima legati all'anticorpo stesso, che emettendo luce fluorescente o convertendo un reagente colorato, rendono visibile la molecola. Questa tecnica gioca un ruolo chiave nell'iter diagnostico del tumore polmonare: permette, infatti, di fare diagnosi differenziale tra la neoplasia polmonare e altri tipi di tumore maligno che originano da altri tessuti/cellule, permette di distinguere l'istotipo specifico di tumore polmonare (ACD, SCC o tumore neuroendocrino) e, infine, permette la valutazione della presenza dei riarrangiamenti di *ALK* e *ROS1* e dei livelli di PD-L1. L'immunoistochimica è una tecnica economica, facilmente e rapidamente reperibile, inoltre, può essere eseguita anche con un esiguo numero di cellule disponibili. La precisione di questa procedura può però essere compromessa da un'inadeguata gestione preanalitica e analitica del campione, per cui è importante avere un laboratorio ben attrezzato e del personale ben formato nell'esecuzione del test e lettura dei risultati (51). La PCR o *Polymerase Chain Reaction* è una tecnica molecolare che permette una rapida amplificazione di una specifica sequenza di DNA, ottenendo numerosi frammenti analizzabili a partire

anche da campioni biotici esigui. Attraverso l'aggiunta dei vari reagenti e tramite consecutivi passaggi di riscaldamento e raffreddamento del campione, favorisce la separazione dei filamenti di DNA e la loro successiva replicazione mediante una DNA polimerasi. Questa tecnica è semplice e di facile esecuzione, fornendo rapidamente numerose copie della sequenza di DNA da analizzare. Esistono poi numerose varianti della PCR, che vengono applicate in diversi campi scientifici e medici. Tra queste la RT-PCR è una metodica che simultaneamente amplifica e quantifica il DNA, tramite l'uso di colorazioni fluorescenti che si intercalano con i filamenti di DNA. Questa è attualmente la metodica gold standard per l'analisi di mutazioni puntiformi e/o piccole inserzioni o delezioni su DNA. È una tecnica rapida ed economica, con un'alta sensibilità diagnostica che permette di rilevare anche basse percentuali di allele mutato (fino a <0,5%). La digital-PCR rappresenta un'altra evoluzione tecnologica della classica PCR: il termine *digital* si riferisce alla modalità binaria di rilevazione (presenza/assenza) del segnale di amplificazione (34). Le tecniche basate sulla PCR hanno un'elevata sensibilità e una buona specificità, ma hanno come limite il fatto di poter ricercare e analizzare solo alcuni tipi di alterazioni genetiche (che devono essere già note per la produzione dei primer), inoltre possono vagliare solo un numero limitato di loci per analisi. Per di più, gli enzimi usati nella reazione di amplificazione possono produrre degli errori oppure possono essere presenti frammenti di DNA contaminanti il campione in esame, che ne compromettono il risultato.

### 3.5.1 EGFR

La molecola EGFR appartiene alla famiglia dei recettori tirosin-chinasici ErbB ed è una proteina transmembrana, attivata dal legame con le proteine della famiglia EGF, dei fattori di crescita. Le sue mutazioni, presenti in diversi tipi di tumore oltre a quello polmonare, sono responsabili della trasformazione maligna delle cellule, favorendo la loro sopravvivenza e proliferazione (25). Mutazioni attivanti questo recettore si riscontrano nel 10-20% dei pazienti caucasici (soprattutto donne) con adenocarcinoma, ma la prevalenza è ancor più alta nei pazienti asiatici. Nel 90% dei casi si tratta di delezioni nell'esone 19 e della sostituzione L858R dell'esone 21 (mutazioni attivanti). Altre mutazioni di *EGFR* coinvolgono gli esoni 18 e 20. Nello specifico, la sostituzione T790M nell'esone 20 è il principale meccanismo di

resistenza contro i farmaci TKIs di prima e seconda generazione usati per trattare i pazienti con mutazioni attivanti *EGFR* (50-60% dei casi). La ricerca di questa mutazione è d'obbligo nei pazienti mutati che mostrano una progressione o una recidiva di malattia, dopo target therapy. Tra gli altri meccanismi di resistenza ai TKI di prima, seconda e terza generazione vi sono: altre rare mutazioni puntiformi che modificano la struttura di *EGFR*, l'attivazione di vie alternative di trasduzione del segnale intracellulare (e.g. l'amplificazione di *MET*), la modifica del fenotipo istologico e l'attivazione di molecole a valle di *EGFR*. Vanno sottoposti all'analisi mutazionale di *EGFR* tutti i pazienti con NSCLC a istotipo ADC, CGC, misto con ADC e NAS; tra i pazienti con carcinoma squamoso le linee guida raccomandano di testare i pazienti giovani o non fumatori. L'analisi va fatta su un pezzo operatorio, un prelievo biotipico o citologico del tumore o di una sua metastasi. Nel caso in cui non si riesca a ottenere un'adeguata quantità e qualità del materiale tissutale o citologico, evenienza non rara tra i pazienti con nuova diagnosi di NSCLC avanzato, è indicata l'analisi delle alterazioni degli esoni 18-19-20-21 di *EGFR* su ctDNA estratto da plasma. Numerosi studi hanno dimostrato una buona specificità del test (>90%), anche se la sensibilità risulta essere inferiore (tra il 50% e l'80%), a seconda del test impiegato (26, 27).

### 3.5.2 BRAF

*BRAF* è un membro della famiglia delle Raf chinasi, delle proteine coinvolte nella trasduzione di meccanismi di crescita all'interno delle cellule. Le mutazioni di *BRAF* (la più frequente è la sostituzione V600E) si riscontrano nel 1,5-3,5% dei NSCLC e provocano un'attivazione costitutiva della via delle MAPK, con conseguente proliferazione cellulare (28). La presenza della mutazione V600E di *BRAF* è più frequente negli ADC ed è mutualmente esclusiva con quella delle mutazioni di *EGFR* e *KRAS*. Possono essere sottoposti al test i pazienti con NSCLC a istotipo ADC, CGC, misto con ACD e NAS, utilizzando un pezzo operatorio o un prelievo biotipico o citologico. Nel caso il campione tissutale o citologico sia di quantità o qualità inadeguate, le linee guida raccomandano la ricerca della mutazione su ctDNA estratto da plasma, solo dopo valutazione dello specifico caso clinico da parte di un gruppo multidisciplinare.

### 3.5.3 ALK

L'acronimo *ALK* si riferisce al gene del recettore tirosin-chinasico del linfoma anaplastico (29, 30). Nell'ambito del tumore polmonare si possono trovare fusioni di questo gene con diversi partner (il più frequente è *EML4*) nel 3-7% dei pazienti. Queste alterazioni sono più frequenti in pazienti femmine, giovani, non fumatori, ex o deboli fumatori (da almeno 15 anni; <5 sigarette/die o <15 pacchetti/anno) con istotipo ADC, CGC, misto ADC e NAS. Tra i meccanismi di resistenza coinvolgenti *ALK*, vi sono le alterazioni del dominio tirosin-chinasico, ma anche altri meccanismi *ALK*-indipendenti simili a quelli visti per *EGFR* (e.g. alterazioni di altri oncogeni e vie di trasduzione o cambiamenti fenotipici). Storicamente l'indagine diagnostica di riferimento per la determinazione di *ALK* era la FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*), ma negli ultimi anni sono emerse evidenze a supporto dell'immunoistochimica, che identifica tre score per definire la positività/negatività del test: lo score 0 indica un test negativo per *ALK*, lo score 3+ ne indica la positività. Nel caso di score 1+/2+ è necessario eseguire un test FISH per avere conferma del risultato. Ad oggi è possibile analizzare i riarrangiamenti di *ALK* anche con specifici pannelli in NGS.

### 3.5.4 ROS1

*ROS1* è un recettore tirosin-chinasico strutturalmente simile alla proteina *ALK* ed è un proto-oncogene espresso in numerosi tipi di tumore. I riarrangiamenti nel cromosoma 6 coinvolgenti il gene *ROS1* sono presenti nel 1-3% degli adenocarcinomi polmonari (31), nei pazienti non fumatori o ex o deboli fumatori. L'indagine di riferimento per determinare i riarrangiamenti di questo gene è sempre stata la FISH, e a oggi si usa l'immunoistochimica come modalità di screening: in caso di IHC positiva, dovrà seguire una conferma tramite FISH. Tra le più recenti evidenze presenti in letteratura è possibile anche effettuare analisi di *ROS1* tramite specifici pannelli NGS, utili per individuare eventuali mutazioni di resistenza a Crizotinib (e.g. la G2032R) (52).

### 3.5.5 NTRK

I riarrangiamenti dei geni *NTRK* sono responsabili dell'oncogenesi di vari tumori sia tra i bambini sia tra gli adulti, tra cui il tumore polmonare non a piccole cellule (32). Sono stati recentemente approvati in Europa come targets per la terapia con inibitori delle tirosin-chinasi. La prevalenza di queste alterazioni tra gli adenocarcinomi polmonari è molto bassa, intorno lo 0,5-1%. La loro presenza viene vagliata tramite test immunoistochimici, per poi essere confermata tramite FISH o pannelli NGS. Considerato il numero delle determinazioni da eseguire è da preferire un test basato sull'NGS, per valutare tutte le possibili traslocazioni di *NTRK*.

### 3.5.6 PD-L1

Il PD1 e il suo ligando PD-L1 sono due molecole che regolano l'attivazione delle cellule T del sistema immunitario nei confronti delle altre cellule dell'organismo. In particolare, PD-L1 viene esposto sulla superficie cellulare e in questo modo lega il recettore PD1 sulle cellule T, impedendo alle seconde di distruggere le prime. Alcune cellule tumorali però sono in grado di esprimere la molecola di PD-L1, eludendo così l'azione *killer* del sistema immunitario. La misura dell'espressione di PD-L1 è raccomandata per tutti i pazienti con nuova diagnosi di NSCLC in stadio avanzato per individuare i soggetti elegibili per l'immunoterapia con inibitori del checkpoint immunitario PD1 (come Pembrolizumab) o PD-L1 (come Atezolizumab). L'analisi di PD-L1 può essere svolta su pezzo operatorio, prelievo biotico o citologico del tumore primitivo o di una sua metastasi e dev'essere fissato in formalina e incluso in paraffina sottoforma di *cell-block*. Prima di analizzare il reperto con tecniche d'immunoistochimica, è necessario valutare l'adeguatezza del preparato, che deve presentare al suo interno un numero di cellule neoplastiche non inferiore a 100. Per interpretare il risultato del test si applica il "*Tumor Proportion Score*" o TPS, che valuta la percentuale di positività di PD-L1 sulla membrana delle cellule neoplastiche nel campione.



### 3.6 Biopsia liquida

Con il termine biopsia liquida ci si riferisce all'uso di fluidi biologici come surrogato del tessuto neoplastico per ottenere informazioni utili nella diagnosi, nella definizione della prognosi e nella scelta terapeutica: essa permette sia l'identificazione di mutazioni driver nel DNA tumorale circolante (ctDNA) che lo studio delle cellule tumorali circolanti (CTC) (34). Ad oggi tra i diversi analiti in fase di studio solo il ctDNA estratto da plasma e le CTCs sono stati approvati dall'FDA nella pratica clinica (35, 40). Il ctDNA rappresenta una frazione del cfDNA (*cell free DNA*) totale, il quale contiene anche una parte di DNA derivante da cellule non neoplastiche. Queste molecole sono stabili e mantengono le caratteristiche genetiche ed epigenetiche distintive delle cellule da cui provengono, per cui possono essere usate come biomarcatori per la rilevazione e monitoraggio di diversi disordini genomici. Le quantità di materiale sono abbastanza esigue e si parla in genere di pochi ng/ml di cfDNA, inoltre, esistono diversi fattori che ne influenzano la concentrazione, come: lo stadio di malattia, i livelli di espressione della mutazione nelle cellule del tumore primitivo, la velocità di rilascio del ctDNA nel torrente circolatorio e i livelli di DNA derivante da cellule non trasformate (da processi infiammatori o per lisi dei globuli bianchi dopo il prelievo) (37 - 39) (Figura 3).

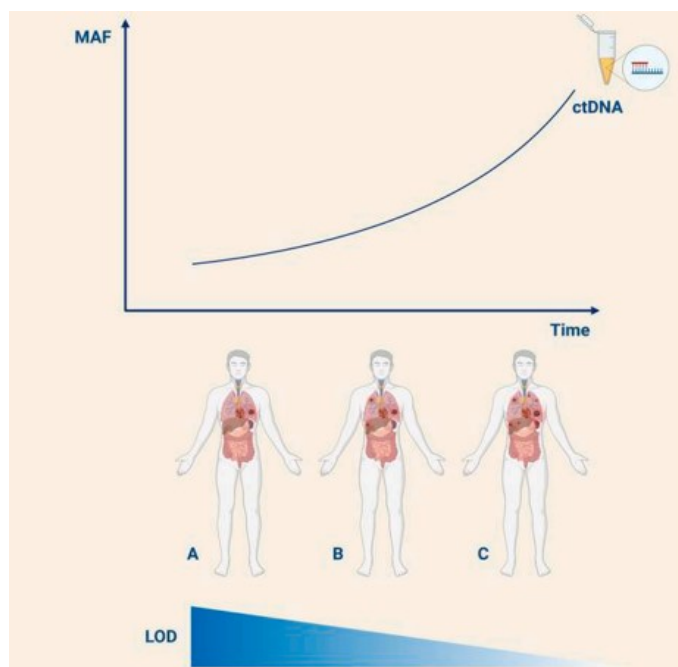


Figura 3. Concentrazione ctDNA in rapporto allo stage (35)

La biopsia liquida e l'analisi del ctDNA e delle CTCs sono diventati versatili strumenti della medicina di precisione, potendoli applicare per numerosi scopi, come: il rilevamento precoce del tumore, l'identificazione di mutazioni driver candidabili a target therapy, la stadiazione e monitoraggio dei pazienti con malattia localizzata, predire una recidiva o rilevare una progressione di malattia, monitorare l'efficacia di una determinata terapia, seguire l'evoluzione tumorale e identificare meccanismi di resistenza ai trattamenti (37).

La biopsia liquida presenta, quindi, alcuni evidenti vantaggi rispetto alla biopsia solida, anche se entrambe hanno delle limitazioni, come riassunto nella Tabella 1 (36):

**Tabella I.** *Vantaggi e svantaggi della biopsia solida vs. biopsia liquida.*

<b>Biopsia solida (prelievi istologici o citologici)</b>	<b>Biopsia liquida</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Il campione istologico è il gold standard nella diagnosi oncologica, perché permette una migliore diagnosi differenziale e l'esecuzione di diversi test molecolari;</li> <li>• Campioni più frequenti rispetto al pezzo operatorio intero (il 70% dei pazienti alla diagnosi non è, infatti, reseccabile)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Minimamente invasiva;</li> <li>• Ripetibile in diversi momenti della malattia del paziente;</li> <li>• Rappresenta in modo più esaustivo l'eterogeneità molecolare della malattia, contenendo DNA derivante dalle diverse lesioni tumorali;</li> <li>• Numerose applicazioni cliniche attuali (e altre ancora in fase di studio per il futuro).</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Campioni spesso insufficienti per eseguire tutte le analisi molecolari;</li> <li>• Campioni non sempre rappresentativi dell'intero tumore;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Non fornisce la diagnosi della neoplasia</li> <li>• La quantità di ctDNA nel contesto del cfDNA è spesso limitata, con possibili falsi negativi;</li> </ul>

<ul style="list-style-type: none"> <li>• Necessari numerosi prelievi (almeno 4 frustoli/aspirazioni);</li> <li>• Poco ripetibile;</li> <li>• Può non esservi un adeguato numero di cellule tumorali da studiare.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Problematiche metodologiche e tecnologiche riguardo la raccolta, processazione, conservazione del campione e l'isolamento e conservazione del cfDNA.</li> </ul>
---	--

Per quanto riguarda gli aspetti tecnici, tra le procedure pre-analitiche rientrano tutti i passaggi che dal prelievo del sangue intero arrivano, attraverso l'estrazione del plasma tramite centrifugazione, all'estrazione del cfDNA pronto per essere analizzato. Esistono numerosi kit e protocolli metodologici, ma a causa del recente e rapido sviluppo di questo campo, non si è ancora raggiunto un consenso internazionale sulle procedure ottimali da seguire nella pratica clinica.

### 3.7 Analisi NGS

Il termine NGS o *Next Generation Sequencing* indica una tecnica di analisi molecolare che permette di sequenziare in parallelo grandi quantità di materiale genetico in un tempo ristretto e permette di rilevare contemporaneamente tutti i diversi tipi di alterazioni genetiche driver/target (anche rare o sconosciute) in più geni, in una singola seduta analitica (36). Questo aspetto rappresenta un importante vantaggio rispetto alle metodiche precedentemente descritte, riunendo tutte le valutazioni molecolari d'interesse clinico in un solo esame eseguito su un unico campione. D'altro canto, si tratta comunque di una tecnica che richiede l'uso di particolari reagenti e di uno strumentario adeguato, così come di personale esperto nella gestione dei campioni e del dato molecolare, condizioni che possono non essere alla portata di tutti i centri oncologici. Infatti, i test NGS sono spesso eseguiti in laboratori centralizzati che dispongono delle adeguate risorse, un aspetto che può allungare l'intervallo di tempo necessario per ottenere il risultato dell'analisi.

Attualmente le tecnologie basate su NGS sono in grado di rilevare alleli mutati con una frequenza allelica inferiore all'1% (*MAF* o *Mutant Allele Frequency*, dallo 0,1% allo 0,01%). Queste tecniche possono essere applicate usando pannelli *target*,

per il rilevamento specifico e altamente sensibile di particolari mutazioni nel DNA, o tramite sequenziamento dell'intero genoma (*WGS, Whole Genome Sequencing*), identificando più ampie alterazioni di struttura (attualmente quest'approccio è ancora sperimentale). Nella pratica clinica si preferiscono i pannelli NGS *targeted*, rispetto ai test *Whole-Genome* o *Whole-Exome*, perché permettono una maggior copertura d'analisi delle regioni genomiche d'interesse, con una miglior rilevazione delle alterazioni, fornendo ai clinici informazioni rapidamente trasferibili nella pratica (43). Ad oggi sono disponibili molti pannelli NGS: alcuni coprono poche decine di geni, altri arrivano anche a vagliarne oltre 500. Quasi tutti analizzano solo il DNA estratto da biopsie tissutali o liquide, ma alcuni includono anche analisi dell'RNA circolante, soprattutto per la ricerca di fusioni geniche e altre alterazioni difficili da individuare nell'acido nucleico a doppio filamento (ad esempio, la mutazione *skipping* dell'esone 14 del gene *MET*). Gli approcci *untargeted* possono avere una sensibilità ridotta rispetto ai test più mirati, ma non richiedono conoscenze preliminari delle alterazioni d'interesse (34).

Le due tipologie di test NGS base si fondano sugli ampliconi e sull'acquisizione ibrida. Nei test *amplicon-based* si usano numerosi primers PCR per amplificare le regioni del genoma d'interesse; questi test hanno come limite il fatto di non poter lavorare con un elevato numero di geni e regioni, per cui si tratta spesso di piccoli pannelli che analizzano specifici *hot spots* o specifiche regioni genomiche d'interesse clinico. Inoltre, molti di questi test non sono in grado di rilevare fusioni di geni o CNV (*Copy Number Variations*), ma in compenso hanno una migliore sensibilità nell'individuare determinate alterazioni target anche lavorando con un'esigua quantità di materiale (43). Di questi sistemi i più comunemente usati sono: il Tagged-Amplicon deep sequencing (TAm-Seq), il Safe-Sequencing System (Safe-SeqS), il Cancer Personalized Profiling (CAPP-Seq), il Bias-Corrected Target NGS e il Multiplex-PCR NGS combinato con sistema UMI. Nella TAm-Seq vi è una prima preamplificazione di specifiche regioni genomiche, successivamente ri-amplificate eliminando i prodotti non specifici; presenta una sensibilità del 97%, rilevando alterazioni a bassa frequenza fino al 2%. La sua forma più evoluta, l'enhanced TAm-Seq (eTAm-Seq) ha una sensibilità minore (94%), ma è in grado di rilevare alterazioni ancor più rare (frequenza allelica 0,25-0,33%). La Safe-SeqS ha una sensibilità del 98%. La CAPP-Seq usa oligonucleotidi di DNA preparati precedentemente, per l'ibridizzazione con specifiche regioni d'interesse,

permettendo la rilevazione di particolari mutazioni individuo-specifiche (sensibilità 100%; frequenza allelica 0,02%). Il Bias-Corrected Target NGS è un nuovo sistema in grado di massimizzare la rilevazione dei target, minimizzando gli artefatti di sequenza, usando piccole sonde che si legano a dei tags di sequenza per poi amplificarli; ha una sensibilità e specificità vicine al 100% e rileva alleli a bassissima frequenza (0,1%). Infine, il Multiplex-PCR con UMI combina l'amplificazione tramite PCR con il sistema UMI per il sequenziamento, con una sensibilità del 99%. D'altro canto, i pannelli *hybrid-capture* usano la tecnica d'ibridizzazione per analizzare ampie regioni genomiche, identificando mutazioni, CNV e riarrangiamenti genici; ovviamente si tratta di test più complessi e che richiedono un maggior tempo di lavorazione, ma forniscono un'ampia valutazione dell'assetto molecolare della malattia anche avendo a disposizione piccoli campioni di materiale (43). Tra questi ci sono i sistemi PARE, in grado di rilevare riarrangiamenti genomici, la Digital Karyotyping, particolarmente utile per l'analisi di genomi tumorali fortemente aberranti e per identificare grandi anomalie del DNA, e infine la Fast-Seqs, che amplifica in modo specifico le regioni ripetute ed è usato per rilevare le CNV (35). L'applicazione su larga scala di questa tecnologia per la caratterizzazione molecolare dei tumori ha anche portato alla redazione di database, che catalogano le alterazioni genomiche rilevate con NGS, e ha portato allo sviluppo di numerosi strumenti online, che ne permettono l'interpretazione. In questo modo i clinici hanno uno strumento utile e di facile utilizzo per identificare le alterazioni target, potendo indirizzare i pazienti alle terapie più specifiche (41).

L'analisi NGS su DNA e RNA viene ad oggi utilizzata nei pazienti con NSCLC per rilevare le alterazioni dei geni target *EGFR*, *BRAF*, *ALK*, *ROS1*, *MET*, *HER2*, *RET* e *NTRK1/2/3*. Considerando però che molte delle mutazioni druggable sono spesso mutualmente esclusive, la simultanea valutazione di tutti questi geni non sempre è giustificata. È invece importante considerare i pannelli NGS per una miglior analisi dei pazienti che non hanno mostrato alterazioni driver agli altri test molecolari: una buona parte dei pazienti con NSCLC non correlato al fumo può avere una mutazione dei suddetti geni, per cui è fondamentale individuarli per iniziare subito la terapia più corretta. L'NGS può essere applicato sia su campioni tissutali/citologici che su biopsia liquida, utile e valida alternativa visto che circa il 30% dei pazienti in stadio avanzato ha difficoltà a svolgere esami più o meno invasivi (come il prelievo istologico o citologico) per la caratterizzazione

molecolare. Confrontando i dati di sequenziamento NGS, si è visto però un basso livello di concordanza tra i test eseguiti su tessuto e quelli su ctDNA, mentre la corrispondenza arrivava al 97% tra le mutazioni rilevate nelle biopsie delle metastasi e il ctDNA. Queste differenze sono probabilmente legate all'eterogeneità tumorale o alle mutazioni associate all'emopoiesi clonale, di geni coinvolti in sindromi mielodisplastiche e/o processi di leucemogenesi. Per riuscire a distinguere le mutazioni tumorali da quelle da emopoiesi clonale, le linee guida suggeriscono di conservare le frazioni di cellule mononucleate ottenute dalla separazione del plasma, per poi analizzarne il DNA e stabilire l'origine di tali varianti (40).

L'analisi NGS di biomarker su ctDNA da plasma ha chiaramente dimostrato la sua utilità nei pazienti con NSCLC: diversi studi hanno infatti riportato la sua alta sensibilità nel rilevare alterazioni *targettabili* dei geni *EGFR*, *KRAS* e *BRAF*. In particolare, *EGFR* è stato il primo per cui è stato approvato quest'approccio e l'analisi NGS da biopsia liquida viene ad oggi proposta dai gruppi multidisciplinari in questi scenari clinici:

- 1) Nei pazienti con nuova diagnosi di NSCLC avanzato, naïve per qualsiasi tipo di trattamento, in cui la quantità e/o qualità di tessuto disponibile non siano sufficienti a effettuare le analisi molecolari previste o nei casi in cui l'analisi molecolare su tessuto sia risultata inadeguata (**Figura 4**);

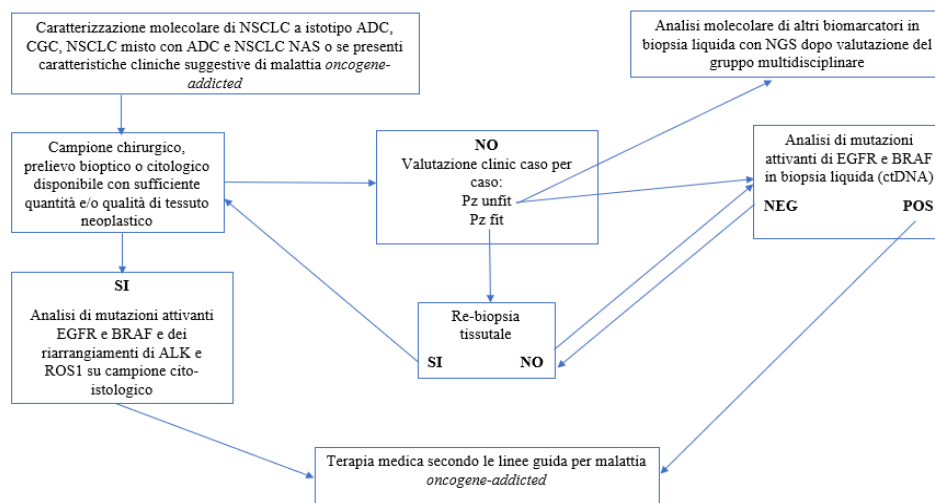


Figura 4. Paziente NSCLC metastatico *oncogene-addicted* non pre-trattato (2)

- 2) Nei pazienti *EGFR*-mutati in progressione nonostante terapia di prima linea con inibitori del dominio tirosin-chinasico di *EGFR* di prima o seconda generazione, per la ricerca della mutazione di resistenza p.T790M dell'esone 20 di *EGFR*, al fine di indirizzare un trattamento con TKI di terza generazione (**Figura 5**).

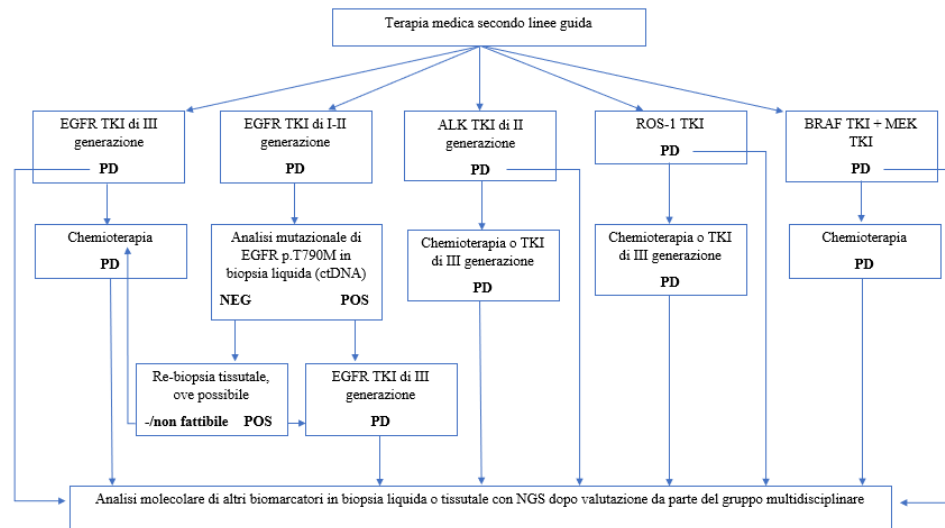


Figura 5. Paziente NSCLC metastatico oncogene-addicted pre-trattato con TKI (2)

Ad oggi, nei pazienti affetti da NSCLC avanzato non pre-trattato, l'NGS implementato in centri adeguati risulta la tecnologia biomolecolare migliore da usare per valutare lo stato mutazionale di *EGFR*, da preferire anche alle tecnologie tradizionali (come la RT-PCR). Prima dell'approvazione di Osimertinib come farmaco di prima linea per il trattamento del NSCLC avanzato con *EGFR* mutato, nei pazienti già trattati con TKI di prima o seconda generazione, ma in progressione, era ragionevole ricercare in prima battuta la mutazione p.T790M su biopsia liquida (preferibilmente con ddPCR o RT-PCR) e in casi di esito positivo, iniziare una terapia con TKI di terza generazione (Osimertinib); in caso di esito negativo, era indicata l'esecuzione di un test con ddPCR, NGS o altra metodica su tessuto tumorale (34). Ad oggi l'NGS viene utilizzato ricercare mutazioni di resistenza a Osimertinib, come l'amplificazione di *MET*, per cui l'esame svolto su tessuto risulta particolarmente sensibile. I pannelli NGS ad oggi vengono usati anche per rilevare nel gene *ALK* le mutazioni di resistenza al TKI Alectinib: in questo caso l'analisi NGS su tessuto resta l'attuale gold-standard, anche se la profilazione molecolare su plasma sta emergendo come valida alternativa meno invasiva per i pazienti che non presentano sufficiente o adeguato tessuto su cui svolgere le indagini. La valutazione mediante biopsia liquida dello stato mutazionale dei geni *BRAF*, *ROS1*, *NTRK*,

*RET*, *MET*, *HER2* e *KRAS* è ancora da ritenersi una procedura non approvata in pratica clinica, per cui ad oggi si preferiscono ancora le analisi su tessuto; in particolare per *ALK* e *ROS1* esistono anche pannelli NGS che utilizzano DNA complementare (cDNA), ottenuto dall'RNA, per la rilevazione delle loro fusioni e riarrangiamenti. Nonostante ciò, vista la mole di evidenze scientifiche riportate in letteratura a supporto dell'analisi del ctDNA in integrazione ai test su DNA estratto da campioni tissutali, in casi selezionati e discussi nei gruppi multidisciplinari è raccomandabile lo sfruttamento di queste innovative metodiche per migliorare la stesura dei programmi terapeutici in questi pazienti. Le linee guida ESMO, quindi, raccomandano fortemente di eseguire una valutazione molecolare con NGS, su DNA o RNA ottenuto da tessuto o da plasma, nei pazienti con NSCLC non-squamoso, al fine di rilevare le alterazioni target dei geni sopracitati, che possono beneficiare di una terapia a bersaglio molecolare (53).

Come ulteriore possibile futura applicazione dell'NGS e della biopsia liquida, si cita la possibilità di fare diagnosi precoce di cancro al polmone tramite questi due strumenti. Questo approccio è ancora in fase di definizione, ma si prospetta promettente. Tali esami potrebbero quindi svolgere in futuro un ruolo nello screening di tumori nei soggetti asintomatici, indirizzandoli poi a un adeguato trattamento. Inoltre, è stato suggerito un ruolo del ctDNA per la diagnosi differenziale dei noduli polmonari sospetti, distinguendo tra benigni e maligni, permettendo così un invio precoce alla chirurgia dei secondi (35).

### **3.8 Stadiazione**

L'ultimo step dell'iter diagnostico consiste nell'accurata valutazione dello stadio della neoplasia. Questa procedura, definita con il termine anglosassone di *staging*, è standardizzata a livello mondiale e fornisce fondamentali informazioni sull'estensione anatomica del tumore, con anche un importante valore prognostico e terapeutico per il paziente (23, 24). Si distinguono due tipologie di stadiazione: la stadiazione clinica e la stadiazione patologica. La stadiazione clinica si basa su tutte le informazioni ottenute dall'esame obiettivo, dagli esami ematologici, dagli esami radiologici, dalla biopsia e dall'endoscopia. La stadiazione patologica, invece, si basa sulle informazioni derivanti dall'analisi anatomopatologica effettuata sul



pezzo operatorio. La stadiazione patologica viene ritenuta più accurata, essendo il risultato di un'analisi più completa del tumore, valutato nella sua interezza. Le due stadiazioni sono tra loro complementari. La stadiazione si basa sulla classificazione TNM (tumore-linfonodi-metastasi), che riporta la descrizione di tre diversi parametri:

- T che sta per *tumor*, valuta l'estensione del tumore primitivo;
- N che sta per *nodes*, valuta l'assenza o la presenza ed estensione dell'interessamento linfonodale;
- M che sta per *metastasis* valuta l'assenza o la presenza di metastasi a distanza.

I valori combinati di questi tre parametri permettono, quindi, di stadiare la malattia, distinguendo tra una malattia allo stadio iniziale (stadi I-II), localmente avanzato (stadio III) o avanzato/metastatico (stadio IV), che come accennato prima hanno prognosi ed approcci terapeutici assai differenti.

**Tabella II.** *Classificazione TNM (VIII edizione)*

<b>Classificazione TNM</b>	
<b>T – tumore primitivo</b>	
<b>TX</b>	Il tumore primitivo non può essere definito, oppure ne è provata l'esistenza per la presenza di cellule tumorali nell'escreato o nel liquido di lavaggio bronchiale, ma non è visualizzato con le tecniche per immagini o con la broncoscopia.
<b>T0</b>	Nessuna evidenza di tumore primitivo
<b>Tis</b>	Carcinoma in situ
<b>T1</b>	Tumore di 3 cm o meno di diametro massimo, circondato da parenchima polmonare o pleura viscerale, senza evidenza alla broncoscopia di invasione più prossimale del bronco lobare
<b>T1a(mi)</b>	Adenocarcinoma minimamente invasivo
<b>T1a</b>	Tumore non superiore a 1 cm nella dimensione maggiore
<b>T1b</b>	Tumore superiore a 1 cm ma non superiore a 2 cm nella dimensione maggiore

<b>T1c</b>	Tumore superiore a 2 cm ma non superiore a 3 cm nella dimensione maggiore
<b>T2</b>	Tumore superiore a 3 centimetri ma non superiore a 5 cm, o tumore con una qualunque delle seguenti caratteristiche: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Interessamento del bronco principale, ma non della carena;</li> <li>• Invasione della pleura viscerale;</li> <li>• Associazione a polmonite ostruttiva o atelettasia.</li> </ul>
<b>T2a</b>	Tumore superiore a 3 cm ma non superiore a 4 cm nel diametro maggiore
<b>T2b</b>	Tumore superiore a 4 cm ma non superiore a 5 cm nel diametro maggiore
<b>T3</b>	Tumore superiore compreso tra i 5 e i 7 cm nel diametro maggiore o associato a nodulo(i) neoplastici separati nello stesso lobo del tumore primitivo o che invade direttamente una delle seguenti strutture: parete toracica (inclusa la pleura parietale ed i tumori del solco superiore), nervo frenico, pericardio parietale.
<b>T4</b>	Tumore superiore a 7 cm nel diametro maggiore o associato a nodulo(i) separato(i) in un lobo ipsilaterale, ma differente rispetto al lobo del tumore primitivo o che invade direttamente una delle seguenti strutture: diaframma, mediastino, cuore, grandi vasi, trachea, nervo laringeo ricorrente, esofago, corpo vertebrale, carena.
<b>N – linfonodi locoregionali</b>	
<b>NX</b>	I linfonodi regionali non possono essere valutati
<b>N0</b>	Assenza di metastasi nei linfonodi regionali
<b>N1</b>	Metastasi nei linfonodi peribronchiali e/o ilari ipsilaterali e intrapolmonari, incluso il coinvolgimento per estensione diretta
<b>N2</b>	Metastasi nei linfonodi mediastinici e/o sottocarenali ipsilaterali
<b>N3</b>	Metastasi nei linfonodi mediastinici controlaterali, ilari controlaterali, scaleni o sovraclaveari ipsi- o contro-laterali
<b>M – metastasi a distanza</b>	
<b>M0</b>	Assenza di metastasi a distanza

<b>M1a</b>	Noduli tumorali in un lobo controlaterale rispetto al tumore primitivo; tumore con noduli pleurici/pericardici o versamento neoplastico pleurico o pericardico
<b>M1b</b>	Singola metastasi extra toracica
<b>M1c</b>	Multiple metastasi extra toraciche in uno o più organi

**Tabella III. Raggruppamento in stadi (VIII edizione)**

<b>Raggruppamento in stadi</b>			
<b>Stadio</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>
<b>Stadio IA1</b>	T1a(mi)/T1a	N0	M0
<b>Stadio IA2</b>	T1b	N0	M0
<b>Stadio IA3</b>	T1c	N0	M0
<b>Stadio IB</b>	T2a	N0	M0
<b>Stadio IIA</b>	T2b	N0	M0
<b>Stadio IIB</b>	T1a,b,c	N1	M0
	T2a,b	N1	M0
	T3	N0	M0
<b>Stadio IIIA</b>	T1a,b,c	N2	M0
	T2a,b	N2	M0
	T3	N1	M0
	T4	N0,1	M0
<b>Stadio IIIB</b>	T1a,b,c	N3	M0
	T2a,b	N3	M0
	T3	N2	M0
	T4	N2	M0

<b>Stadio IIIC</b>	T3	N3	M0
	T4	N3	M0
<b>Stadio IVA</b>	Qualsiasi T	Qualsiasi N	M1a,b
<b>Stadio IVB</b>	Qualsiasi T	Qualsiasi N	M1c

## 4. Terapia e prognosi del NSCLC

### 4.1 Terapia della malattia in stadio precoce

La terapia degli stadi più precoci di NSCLC si basa principalmente sulla chirurgia, tecnica che permette di ottenere una guarigione completa o comunque di migliorare significativamente la prognosi di questi pazienti. In circa il 40% dei pazienti è possibile diagnosticare una malattia potenzialmente resecabile (6). Perché tale approccio possa garantire il miglior livello di cura possibile, dev'essere eseguito in centri di chirurgia toracica con elevata esperienza, ampio volume e case mix: una resezione non radicale, infatti, si associa a una prognosi sovrapponibile a quella dei pazienti non operati. Per pazienti con malattia precoce operabili, s'intende i pazienti di stadio I, II e anche alcuni in stadio IIIA/IIIB (T1-T3, N2 singola stazione, non-bulky, valutati da gruppi multidisciplinari). Tra i criteri di operabilità ci sono: l'operabilità biologica, ovvero la prospettiva di radicalità, l'operabilità anatomica, ovvero il minor volume di resezione possibile per ottenere la radicalità, e l'operabilità funzionale, che tiene conto della capacità respiratoria predetta dopo l'intervento. Un paziente viene quindi definito operabile, se presenta una malattia resecabile ed è in grado di tollerare funzionalmente l'intervento (2). Una resezione radicale è ritenuta tale quando si ottiene l'asportazione di tutta la malattia visibile, i margini di resezione sono istologicamente negativi e viene eseguita una linfadenectomia ilo-mediastinica o un campionamento delle stazioni linfatiche che drenano la neoplasia (6). La lobectomia associata a linfadenectomia ilo-mediastinica rappresenta infatti l'approccio chirurgico standard nel tumore al polmone; la segmentectomia può essere attuata per lesioni non solide a "ground glass" o per stadi molto precoci (Tis o T1a). Se la lesione non permette una lobectomia o c'è un importante sconfinamento trans-scissurale, allora è indicata la

pneumectomia. Nei pazienti con importante deficit funzionale, che non possono sopportare resezioni maggiori, e in presenza di lesione favorevole per dimensioni, stadio e topografia, si può anche eseguire una segmentectomia tipica con linfadenectomia ilo-mediastinica o almeno un sampling sistematico linfonodale. Queste tecniche possono essere svolte con approccio chirurgico tradizionale o tramite VATS e chirurgia robotica. I candidati agli interventi chirurgici devono essere attentamente valutati in ambito preoperatorio dal punto di vista cardiorespiratorio, per controllare che non presentino un rischio operatorio eccessivo e per prevedere se saranno effettivamente autonomi dal punto di vista respiratorio dopo l'intervento. La funzionalità polmonare viene valutata prima e dopo l'intervento con la spirometria, andando a misurare il volume espiratorio massimo nel primo secondo (FEV1) e anche con test di diffusione del monossido di carbonio (DLCO). Tra le possibili complicazioni legate all'intervento abbiamo: fibrillazione atriale e altre aritmie, atelettasia, infezioni polmonari, perdite aeree prolungate, sindrome da distress respiratorio acuto, insufficienza respiratoria, fistola bronchiale, empiema, embolia polmonare. La mortalità si attesta tra il 2% e il 5% e l'età del paziente influisce significativamente solo sulla morbilità. La sopravvivenza globale a 5 anni dopo chirurgia radicale allo stadio I è del 60-80%, nello stadio II del 40-60% e nello stadio III arriva a calare fino al 20-40%. Il rischio di ricaduta sembra essere maggiore nei primi 5 anni (6-10%), ma alcuni dati suggeriscono che si mantenga significativo anche dopo il quinto anno dall'intervento. Il pattern di ricaduta è diverso a seconda del tempo, per cui prevalgono le ricadute locali nei primi due anni e quelle a distanza dopo il terzo anno dalla fine del trattamento primario (2).

Nei pazienti, soprattutto anziani, in stadio precoce non operabili per comorbilità e altre controindicazioni mediche o nei pazienti che rifiutano la chirurgia, una valida alternativa è data dalla radioterapia stereotassica (SBRT, *Stereotactic Body Radiation Therapy* o SABR, *Stereotactic Ablative Radiotherapy*). Questa tecnica permette la somministrazione di dosi biologicamente molto elevate in una o poche frazioni, con percentuali di controllo della malattia elevate, in assenza di tossicità importanti (2).

Il trattamento chirurgico può essere associato a un trattamento chemioterapico adiuvante di 4 cicli, con schemi a base di platino (Cisplatino) in combinazione con

un farmaco chemioterapico di terza generazione (Gemcitabina, Vinorelbina, Etoposide) nei pazienti giovani (<70 anni) con NSCLC operato radicalmente in stadio IIB-III, con buon PS (0-1), in assenza di comorbilità e che abbiano avuto una buona ripresa dopo l'intervento. Questa strategia porta a un miglioramento della sopravvivenza a 5 anni del 4%, rispetto al semplice follow-up (6). Le principali linee guida suggeriscono di adottare questo approccio anche nei pazienti in stadio IIA con tumori di dimensioni >4 cm, valutando il rapporto di rischio/beneficio per il singolo paziente. La chemioterapia adiuvante andrebbe iniziata entro 8 settimane dall'intervento, ma nei pazienti che richiedono un tempo di recupero maggiore dopo l'intervento si può aspettare anche fino a 4 mesi. Per i pazienti anziani le indicazioni non sono ancora così chiare e univoche: i dati sono pochi, soprattutto per i soggetti con più di 75 anni, ma in casi selezionati con cautela può esserci un significativo beneficio. Nei pazienti con NSCLC operato in stadio precoce mutato per *EGFR*, il trattamento adiuvante consiste in 3 anni di osimertinib a integrazione o in alternativa alla chemioterapia adiuvante classica. I risultati del trial ADAURA hanno dimostrato l'efficacia di tale approccio, favorendo l'approvazione anche in Italia dell'uso di Osimertinib nella terapia adiuvante di pazienti con NSCLC radicalmente operato e con mutazioni attivanti *EGFR* (49). Nei pazienti, invece, che hanno un NSCLC operato in stadio precoce con una maggior espressione del PD-L1, il trattamento adiuvante con immunoterapia non è rimborsato in Italia ed è consentito solo all'interno di protocolli di studio (2).

Per il follow-up di questi pazienti le linee guida suggeriscono l'esecuzione periodica di un TC con mdc per i pazienti *fit*, mentre per quelli anziani o *unfit* è preferibile la TC senza mdc o una RX del torace. L'esame andrebbe eseguito ogni tre mesi nei primi due anni, semestralmente nei successivi tre anni e con cadenza annuale dal quinto anno in poi. In assenza di lesioni dubbie o sospette, dopo i primi due anni la TC può essere eseguita senza mdc per tutti i pazienti. Inoltre, nei pazienti con neoplasie centrali, con alto rischio di recidiva al moncone (margini chirurgici <1 cm) e nei pazienti con sedi bronchiali di displasia o carcinoma in situ, è consigliata l'esecuzione di una broncoscopia a un anno dall'intervento. La PET-TC è riservata in caso di reperti sospetti (2).

## 4.2 Terapia della malattia localmente avanzata

I pazienti con malattia neoplastica polmonare localmente avanzata sono complessi da gestire e trattare, per cui è necessario un approccio multimodale supportato dal lavoro di un gruppo multidisciplinare, che permetta anche l'accesso a sperimentazioni cliniche. Questi pazienti vanno valutati a tutto tondo nelle loro condizioni cliniche generali, nell'estensione della malattia, nella presenza di alterazioni target, nella funzionalità respiratoria, nella predizione delle possibili tossicità legate alla terapia (2).

Innanzitutto, va fatta una distinzione tra malattia localmente avanzata resecabile e non resecabile, in base all'estensione del tumore primario, al livello d'interessamento linfonodale e al grado di risposta a eventuali terapie d'induzione. Per i pazienti con malattia N1 è quasi sempre valido il trattamento usato per gli stadi precoci, per quelli con malattia N3 si seguono di più i protocolli dello stadio IIIC, mentre per le malattie N2 la gestione è più complessa e sfumata. Per i pazienti con malattia resecabile localmente avanzata in stadio IIIA e IIIB (con N2 singola stazione) andrebbe valutata la somministrazione di una chemioterapia neoadiuvante a base di platino, seguita da chirurgia, in base al profilo rischi/benefici del paziente. Altre possibili opzioni sono quelle di chirurgia con CT adiuvante e di chemio-radioterapia neoadiuvante seguita da chirurgia. Le terapie neoadiuvanti hanno l'intento di downstaging della neoplasia, mentre la radioterapia post-operatoria (PORT) va eseguita solo in caso di residui micro o macroscopici di malattia. Queste diverse opzioni vanno valutate nell'ambito di un gruppo multidisciplinare, per scegliere la migliore in base al singolo paziente. Nel caso, invece, di malattia non resecabile in stadio IIIB (con N3) o IIIC è raccomandata in prima istanza la caratterizzazione molecolare del tumore con ricerca delle mutazioni *EGFR* e riarrangiamenti di *ALK* e *ROS1*, per valutare la possibilità di prescrivere trattamenti a bersaglio molecolare. In assenza di mutazioni driver è invece indicata l'esecuzione di una chemioterapia a base di platino in concomitanza con la radioterapia. L'identificazione del regime chemioterapico da utilizzare, rimane ancor'oggi un quesito di dibattito, ma di base si preferisce una combinazione di Cisplatino con farmaci di terza generazione (Paclitaxel o Docetaxel), che risultano essere più efficaci e meno tossici rispetto alle precedenti terapie. In seguito, in caso di risposta o stabilità della malattia dopo trattamento chemio-radioterapico a dosi

radicali, e con espressione di PD-L1 $\geq$ 1%, le linee guida raccomandano una terapia di consolidamento con Durvalumab (anti PD-L1) per 12 mesi, sulla base dei risultati dello studio PACIFIC, che hanno evidenziato una PFS significativamente più lunga con questo protocollo, rispetto al placebo (48).

Nel caso di tumori infiltranti la parete toracica (5%), invece, l'intervento chirurgico può non essere sempre indicato, ma in casi selezionati è eseguibile la resezione polmonare anatomica associata a resezione in blocco della parete toracica (fino a margini sicuramente sani) associata a una linfadenectomia radicale sistematica. Similmente, nel tumore di Pancoast può essere considerato l'intervento con lobectomia superiore associata all'asportazione in blocco delle strutture della parete toracica interessate dal tumore; in caso di coinvolgimento linfonodale N2 si preferisce però l'approccio chemio-radioterapico. Se il tumore interessa un bronco principale a meno di 2 cm dalla carena e/o l'arteria polmonare, se le condizioni respiratorie lo consentono, si può eseguire una pneumectomia allargata, con successive ricostruzioni delle vie aeree principali e dei vasi (2).

Il 20-50% dei pazienti con NSCLC metastatico presenta in realtà una malattia oligometastatica, cioè a basso carico (la definizione precisa di questo termine è ancora in fase di discussione tra gli esperti) e con prognosi migliore, per cui il trattamento locale del tumore primitivo e delle metastasi, in aggiunta al trattamento sistemico, può portare a un ottimo controllo della malattia a lungo termine con tassi di sopravvivenza globale a 5 anni tra il 12% e il 52%. La resezione del tumore primitivo e delle sedi oligometastatiche può essere presa in considerazione nei pazienti con un buon PS e un'adeguata funzione polmonare, mentre la RT stereotassica è un trattamento non invasivo che può essere effettuato su polmoni, encefalo, surreni, fegato e ossa (le principali sedi di metastasi di NSCLC). In caso di lesione cerebrale singola in pazienti *fit*, è consigliata la resezione chirurgica con successiva radioterapia nella cavità operatoria, mentre in presenza di più lesioni encefaliche o in presenza di una lesione non operabile, è indicata la RT stereotassica. Anche nella malattia localmente avanzata, se presenta *EGFR* mutato, la strategia terapeutica dovrebbe considerare l'integrazione della terapia sistemica con TKI di II-III generazione (con maggior permeabilità encefalica) con la chirurgia cerebrale e la RT. La gestione del paziente oligometastatico è quindi molto complessa, ma di base la chirurgia e la RT dovrebbero acquisire un ruolo



dominante, perché offrono un approccio locale a scopo curativo, da combinare con una terapia sistemica basata su una decisione multidisciplinare (2).

### 4.3 Terapia della malattia avanzata

Attualmente la scelta del trattamento di prima linea per i pazienti con NSCLC in stadio avanzato/metastatico (gli stadi IIIB/IIIC non suscettibili di trattamenti locoregionali e lo stadio IV) si basa sulla valutazione dei seguenti parametri:

- Caratteristiche cliniche del paziente;
- Istologia;
- Presenza di alterazioni molecolari driver di *EGFR*, *ALK*, *ROS1*, *BRAF* e *NTRK*, che permette di distinguere la malattia in *oncogene-addicted* e non *oncogene-addicted*;
- Livello di espressione di PD-L1.

In questo setting l'intento terapeutico non è quasi mai curativo, quanto più di cronicizzazione della malattia, per allungare la sopravvivenza del paziente (mediana da 4 a 10-12 mesi) e migliorarne la qualità di vita, controllandone i sintomi. L'identificazione di mutazioni *driver* ha radicalmente cambiato la strategia terapeutica nei pazienti con tumore polmonare non a piccole cellule in stadio localmente avanzato o metastatico. Ecco perché è importante individuare queste alterazioni tramite biopsie tissutali o liquide (6).

#### 4.3.1 Malattia *oncogene-addicted*

Esistono numerose alterazioni che condizionano la biologia del tumore polmonare non a piccole cellule e per alcune di esse esistono già *target therapy* estremamente efficaci. Le mutazioni, contro cui i farmaci a bersaglio molecolare agiscono, possono essere distinte in "*druggable*" e "*actionable*": il primo termine indica proteine che possono essere direttamente colpite dal farmaco, il secondo indica proteine appartenenti a pathway alterate, le quali possono essere bersaglio di trattamenti specifici. Secondo le linee guida, tutti i pazienti con istologia non-

squamosa o mista, e pazienti giovani e non fumatori con istologia squamosa pura, dovrebbero essere sottoposti a un'adeguata caratterizzazione molecolare dei geni *EGFR*, *ALK*, *ROS1*, *BRAF* e *NTRK*. In particolare, le alterazioni di *EGFR*, *ALK*, *MET*, *BRAF*, *ROS1*, *NTRK* e *RET* vengono classificate come 'tier I A/B/C' nella scala ESCAT, per cui la terapia con i rispettivi farmaci a bersaglio molecolare permette un significativo beneficio clinico in questi pazienti, come dimostrato da numerosi trial clinici (53). Un'analisi NGS nei pazienti con NSCLC in stadio avanzato è da preferire alle tecniche convenzionali, data la difficoltà di prelevare materiale tissutale da questi soggetti, perché permette l'esecuzione di più test molecolari contemporaneamente a partire dallo stesso campione. Un'eventuale caratterizzazione più estesa sempre con NGS potrebbe, inoltre, essere indicata per identificare altre alterazioni molecolari *driver* suscettibili di trattamento con farmaci specifici all'interno di studi clinici o programmi di accesso allargato. In Italia sono ad oggi approvati e rimborsati i farmaci inibitori tirosin-chinasici di *EGFR*, *ALK*, *ROS1*, *BRAF* e *NTRK* (2).

Un'accurata analisi molecolare è quindi uno strumento imprescindibile per la corretta impostazione del protocollo terapeutico dei pazienti con NSCLC. L'introduzione dell'NGS e la profilazione molecolare estensiva hanno permesso la rilevazione anche di mutazioni non comuni o sconosciute e di alterazioni non direttamente legate al NSCLC, ma presenti in altre patologie oncologiche (47). Per interpretare al meglio questi dati e per consentire l'inserimento dei pazienti all'interno dei nuovi trial clinici, si è resa necessaria l'implementazione dei *Molecular Tumor Boards* (MTB), dei team multidisciplinari di oncologi, chirurghi, consulenti genetici, farmacisti, patologi, radiologi, ma anche di altre figure scientifiche utili nella gestione clinica del paziente (vedi **Figura 4** per i passaggi di valutazione del MTB). Gli scopi di questi gruppi multidisciplinari sono quelli di individuare potenziali alterazioni target tra quelle rilevate alle analisi e di educare e facilitare l'impostazione da parte dei clinici di una strategia terapeutica adatta al paziente in esame, considerando anche le caratteristiche "non molecolari" del paziente in toto (45). Nello studio di Larson et al. venivano inclusi 3328 pazienti con cancro, alcuni senza trattamenti standardizzati disponibili e altri con alle spalle multiple linee terapeutiche fallite: i pazienti che hanno seguito la terapia indicata dal MTB hanno registrato un significativo miglioramento della sopravvivenza, rispetto ai soggetti che hanno ricevuto il trattamento convenzionale (46).

L'interventi dell'MTB sembra quindi migliorare l'outcome clinico dei pazienti oncologici.



Figura 6. Passaggi di valutazione del MTB

I farmaci TKIs di EGFR sono il trattamento di prima linea raccomandato nei pazienti con NSCLC avanzato e mutazioni classiche di *EGFR*. Per mutazioni classiche s'intendono le delezioni dell'esone 19 e la sostituzione L858R dell'esone 21, che rappresentano circa il 90% dei casi. Il restante 10% è rappresentato da alterazioni dette non comuni o rare. È quindi necessario l'impiego di tecnologie in grado d'identificare tutte le mutazioni di *EGFR*, in modo che il caso possa poi essere discusso nell'ambito di un gruppo multidisciplinare, per la scelta del protocollo terapeutico più adatto. In Italia sono approvati e rimborsati per la prima linea di trattamento, diversi TKIs di EGFR di prima, seconda e terza generazione. Osimertinib, TKI di terza generazione, dovrebbe essere preso in considerazione come terapia di prima linea per i pazienti con NSCLC in stadio localmente avanzato o metastatico con mutazioni classiche di EGFR, e secondo le linee guida dovrebbe essere preferito rispetto ai più vecchi TKIs Gefitinib, Afatinib ed Erlotinib. Molto spesso dopo un certo periodo (circa 9-13 mesi) di trattamento dei pazienti con TKIs di EGFR di prima e seconda generazione, può esserci infatti una progressione clinico-radiologica di malattia. Questo è dovuto allo sviluppo da parte del tumore di meccanismi di resistenza, di cui la sostituzione T790M nell'esone 20 è il più frequente (50-60% dei casi). Altre mutazioni puntiformi più rare che conferiscono resistenza sono la D761Y e la L747S sull'esone 19. Queste mutazioni prevedono quindi una modifica del target molecolare del farmaco. Esistono anche altri meccanismi di resistenza acquisita come: l'attivazione di vie alternative di trasduzione del segnale intracellulare (e.g. l'amplificazione di *MET* o di *HER2* e la mutazione di *PIK3CA* o di *BRAF*), la modifica del fenotipo (con trasformazione epitelio-mesenchimale o in SCLC) e l'attivazione di elementi della cascata molecolare a valle di *EGFR* (nella via delle MAPK). Oltre a questi meccanismi di resistenza acquisita, vi è anche la possibilità di avere una resistenza intrinseca, espressione dell'eterogeneità tumorale, per cui il paziente non risponderà fin da subito alla terapia. Tutti questi pazienti dovrebbero quindi essere sottoposti ad

analisi per la ricerca della mutazione di resistenza T790M ed è ragionevole effettuare tale test su ctDNA estratto da plasma, in quanto presenta un'elevata accuratezza diagnostica rispetto all'analisi su tessuto. In caso di esito negativo, però, è sempre necessario procedere al test anche su tessuto tumorale da nuova biopsia, se possibile e accettato dal paziente. Osimertinib può essere preso in considerazione anche in presenza di sostituzione T790M *de novo* di EGFR, e andrebbe introdotto nel programma terapeutico di quei pazienti che sono andati in progressione nonostante l'uso di Gefitinib, Erlotinib, Dacomitinib o Afatinib. Anche in pazienti trattati con Osimertinib si può avere lo sviluppo di resistenza, sia acquisita che intrinseca. Possono verificarsi resistenze attraverso meccanismi *EGFR* dipendenti (e.g. la mutazione C797S), con alterazioni del target, o *EGFR* indipendenti, quali l'attivazione di vie alternative (l'amplificazione di *MET*, che richiederebbe una rebiopsia tissutale), il potenziamento del segnale a valle del recettore (mutazioni di BRAF) e le modificazioni fenotipiche (transizione epitelio-mesenchimale o switch a SCLC). In caso, invece, di inserzioni dell'esone 20, ad oggi si tiene come *standard of care* di prima linea la chemioterapia a base di platino-Pemetrexed, anche se si stanno sviluppando una serie di farmaci potenzialmente attivi ed efficaci (Poziotinib, Mobocertinib), ma disponibili in Italia solo in protocolli clinici sperimentali o in programmi ad accesso allargato/uso nominale. In questi casi è fondamentale la discussione multidisciplinare del caso, anche per permettere l'accesso del paziente a studi clinici e programmi *off-label*. Un'altra possibile strategia d'uso dei farmaci a bersaglio molecolare è quella del trattamento *beyond progression*, ovvero il mantenimento dell'inibitore a fronte di una progressione esclusivamente radiologica di lieve entità e a lenta cinetica, in assenza di sintomatologia clinica legata alla malattia stessa, eventualmente associata a terapie locali (radioterapia, chirurgia, tecniche di radiologia interventistica) in caso di malattia oligoprogressiva. Una volta esaurite le possibilità di trattamento molecolare, i pazienti i cui tumori presentano una mutazione di *EGFR* sono candidati a chemioterapia, di cui l'associazione con Carboplatino, Paclitaxel, Bevacizumab e Atezolizumab potrebbe rappresentare una valida opzione di trattamento, ma ad oggi questa combinazione non è ancora stata approvata in Italia (2).

In caso di malattia NSCLC con riarrangiamenti di *ALK*, la terapia di prima linea era precedentemente rappresentata dal TKI Crizotinib. La maggior parte dei pazienti

trattati con questo farmaco però, sviluppava resistenza e progressione di malattia entro 12 mesi dall'inizio del trattamento. I meccanismi di resistenza implicati possono essere di tipo *ALK*-dipendente (mutazioni puntiformi del dominio tirosin-chinasico) o di tipo *ALK*-indipendente (alterazioni di altri oncogeni e modifiche dei meccanismi di trasduzione trans cellulare). A questi si aggiunge la frequente progressione a livello di SNC, dovuta la particolare tropismo encefalico della malattia *ALK*-riarrangiata e probabilmente anche alla subottimale diffusione di Crizotinib attraverso la barriera ematoencefalica. Ad oggi quindi le linee guida raccomandano l'uso di Alectinib, un TKI di seconda generazione, per trattare in prima linea i pazienti con NSCLC con riarrangiamenti di *ALK*. Grazie a diversi studi condotti su pazienti con NSCLC con alterazioni di *ALK*, sta emergendo l'opinione che i farmaci Ensartinib e Brigatinib dovrebbero essere presi in considerazione come prima linea terapeutica alternativa a Crizotinib, in quanto hanno dimostrato di incrementare la sopravvivenza libera da progressione e la sopravvivenza globale, di ritardare la progressione encefalica e di avere un profilo di tossicità sensibilmente inferiore. Ad oggi Brigatinib è approvato in Italia anche nel trattamento di seconda linea dopo progressione a Crizotinib. Un altro farmaco che si può usare in seconda linea dopo Crizotinib, e rimborsato dal SSN italiano, è Ceritinib, che ha mostrato un'efficacia maggiore rispetto alla classica chemioterapia. I sopracitati meccanismi di resistenza *ALK*-indipendenti (e.g. alterazioni di geni come *EGFR*, *MET*, *c-KIT*, *SRC*, *RAS/MAPK* e *SHP2*, modifiche fenotipiche e istologiche) sembrerebbero più frequentemente coinvolti nel fallimento dei trattamenti con TKI di seconda generazione (52). Lorlatinib è approvato e rimborsato in Italia per la terapia di pazienti con NSCLC avanzato con riarrangiamenti di *ALK*, precedentemente trattati con Alectinib o Ceritinib in prima linea oppure con Crizotinib e un altro TKI. In alcuni casi è possibile seguire anche qui la strategia *beyond progression* associata a terapie locali, per malattie oligoprogressive, come accennato per la malattia *EGFR*-mutata. Infine, come ultima possibilità terapeutica anche per questi pazienti, resta la chemioterapia a base di platino, spesso associato a Pemetrexed (2).

Nel caso di NSCLC localmente avanzato o metastatico con riarrangiamento di *ROS1*, i farmaci attualmente approvati e rimborsati dal Sistema Sanitario Nazionale italiano e usati in prima linea terapeutica sono Crizotinib ed Entrectinib. Fino al 60% dei pazienti però risulta refrattario al trattamento con Crizotinib: sono state

infatti individuate sette diverse mutazioni di *ROS1* che conferiscono resistenza a Crizotinib, di cui la mutazione più frequente è la G2032R (41%) (52). Al momento di progressione clinico-radiologica a questi farmaci, i pazienti *ROS1*-positivi, su indicazione di un gruppo multidisciplinare, possono beneficiare di ulteriori terapie a bersaglio molecolare all'interno di studi clinici o programmi di accesso allargato, basati sull'utilizzo di Ceritinib, Lorlatinib e Repotrectinib. Analogamente a quanto visto per la malattia con alterazioni di *EGFR* e *ALK*, le strategie *beyond progression* e della malattia oligoprogressiva possono rappresentare una possibile opzione, anche se ad oggi mancano ancora evidenze specificatamente dedicate (2).

Nei pazienti affetti da NSCLC in stadio localmente avanzato o metastatico con mutazione *BRAF* V600, può essere presa in considerazione come terapia di prima linea la combinazione di Dabrafenib con Trametinib. Questo schema può essere usato anche come linea terapeutica successiva alla prima linea, nel caso abbiano fatto trattamenti precedenti alternativi. Le mutazioni di *BRAF* non-V600, potrebbero giovare di trattamenti con inibitori di *MEK*, per cui ancora una volta è fondamentale la valutazione di ogni singolo caso all'interno di un team multidisciplinare, valutando la possibilità di arruolamento in studi clinici dedicati (2).

Le linee guida suggeriscono come terapia di prima linea per i pazienti con NSCLC localmente avanzato o metastatico con fusione di *NTRK* l'uso dei TKIs di *NTRK*, ovvero Entrectinib e Larotrectinib. Inoltre, vi sono dati favorevoli all'utilizzo di questi farmaci anche in linee successive alla prima, qualora il dato molecolare di positività per alterazioni di *NTRK* risulti disponibile in un secondo momento.

Oltre alle ormai note alterazioni molecolari di *EGFR*, *ALK*, *ROS1*, *BRAF* e *NTRK*, non bisogna dimenticare i così detti "biomarkers emergenti", per cui esistono diversi studi, con risultati promettenti, che stanno valutando i profili di attività e tollerabilità di alcune molecole di nuova generazione rivolte contro questi targets (ad esempio, le alterazioni *skipping* dell'esone 14 del gene *MET* sembrano essere sensibili ai farmaci Capmatinib e Tepotinib). L'inibitore di *RET*, Selpercatinib, è al momento l'unica di queste molecole ad essere stata approvata, ma senza rimborsabilità, in Italia per il trattamento di pazienti con NSCLC avanzato con riarrangiamenti di *RET*, in progressione dopo precedente trattamento con immunoterapia e/o CT a base di platino (2).

### 4.3.2 Malattia non *oncogene-addicted*

Nei pazienti con NSCLC in stadio avanzato e senza alterazioni molecolari targettabili, la scelta della terapia viene basata sull'istotipo del tumore e sul livello di espressione di PD-L1.

In caso di NSCLC metastatico con livello di espressione di PD-L1 $\geq$ 50%, in assenza di mutazioni di *EGFR* o riarrangiamenti di *ALK* e in assenza di controindicazioni all'immunoterapia (ovvero patologie autoimmuni severe o trapianti d'organo), è raccomandato il trattamento di prima linea in monoterapia con Pembrolizumab o Atezolizumab, in quanto presentano, a confronto con la CT standard, un significativo vantaggio in termini di sopravvivenza globale e di profilo di tossicità (a eccezione ovviamente degli eventi immuno-correlati). Nei pazienti con NSCLC a istologia non squamosa in stadio avanzato, senza mutazioni driver, con buon PS e con un livello d'espressione di PD-L1 $<$ 50%, si può considerare un trattamento di prima linea con una combinazione di platino, Pemetrexed e Pembrolizumab, seguito da una terapia di mantenimento con Pemetrexed e Pembrolizumab in caso di risposta o stabilità di malattia dopo 4 cicli di trattamento. Invece, nel caso di un'istologia squamosa del NSCLC, in pazienti con buon PS (0-1) e livello d'espressione di PD-L1 $<$ 50% è raccomandata la combinazione di Carboplatino, Paclitaxel/Nab-paclitaxel e Pembrolizumab, seguita dal mantenimento con Pembrolizumab, in caso di risposta o stabilità di malattia dopo 4 cicli di trattamento. Pembrolizumab in monoterapia è indicato anche nel trattamento del NSCLC localmente avanzato o metastatico con livello di espressione di PD-L1 $\geq$ 1% e che hanno ricevuto almeno un precedente trattamento chemioterapico. I pazienti con tumore positivo a mutazione di *EGFR* o per *ALK* devono aver ricevuto una terapia mirata prima di ricevere l'ICI. Un'altra strategia oggi disponibile per i pazienti affetti da NSCLC, indipendentemente dall'istologia, è la combinazione dei farmaci che lavorano sull'asse PD-1/PD-L1 con quelli dell'asse CTLA-4: nello studio CheckMate9LA l'aggiunta di Nivolumab e Ipilimumab alla chemioterapia, ha mostrato infatti un miglioramento della sopravvivenza libera da progressione e della sopravvivenza globale dei pazienti (44).

Per i pazienti con tumore polmonare non a piccole cellule in stadio avanzato con PS 0-2, che non presentano alterazioni molecolari target e un livello di espressione di PD-L1 significativo, e in presenza di controindicazioni all'utilizzo dell'immunoterapia, la chemioterapia resta una valida strategia per migliorarne la sopravvivenza, rispetto alle sole cure di supporto. Solitamente si utilizza la doppietta di un farmaco derivato dal platino con un agente di terza generazione (Vinorelbina, Gemcitabina o taxano), per la durata di 4-6 cicli. Per quanto riguarda la scelta del derivato dal platino, il Cisplatino è da preferire al Carboplatino, il quale viene usato in caso di controindicazioni all'utilizzo del primo. Le combinazioni di platino con l'agente di terza generazione sono considerate equivalenti in termini di efficacia, ma presentano diversi profili di tossicità. La Gemcitabina può essere sostituita dal Pemetrexed, in combinazione con il Cisplatino, nei pazienti con NSCLC non squamoso in stadio avanzato non candidabili a ICI in prima linea; successivamente si può anche impostare una terapia di mantenimento in monoterapia con il Pemetrexed (2). L'uso di questo farmaco si è dimostrato vantaggioso nei pazienti con malattia non squamosa, in quanto presentano bassi livelli dell'enzima timidilato-sintetasi, che conferisce resistenza al Pemetrexed. In pazienti con carcinoma non squamocellulare, senza infiltrazione dei grossi vasi e in assenza di crescita endobronchiale, si può usare anche la combinazione di un derivato del platino con il farmaco Bevacizumab (inibitore di VEGF); questa combinazione, invece, non va assolutamente usata in presenza di SCC, in quanto può provocare gravi eventi emorragici, anche fatali, in questi pazienti.

Al momento della progressione di malattia dopo prima linea con CT, la scelta della successiva linea terapeutica deve basarsi sui fattori prognostici del paziente e delle sue risposte ai trattamenti precedenti (6). Le linee guida suggeriscono la possibilità per i pazienti andati in progressione dopo la prima linea chemioterapica, di somministrare un farmaco immunologico come Nivolumab, Atezolizumab o Pembrolizumab. Nei pazienti affetti da NSCLC ad istologia adenocarcinoma, localmente avanzato o metastatico, l'aggiunta di Nintedanib a Docetaxel può essere presa in considerazione, soprattutto per i pazienti con malattia in progressione entro i 9 mesi dall'inizio della terapia di prima linea.

Nei pazienti anziani (>75 anni) o con performance status compromesso (>2), la scelta terapeutica dev'essere estremamente ponderata, magari associata a una



valutazione geriatrica completa, in modo da contrastare la malattia oncologica, ma senza un rischio eccessivo di tossicità dovuto alla terapia (2).

Infine, anche le cure palliative e di supporto sono fondamentali per la corretta gestione del paziente oncologico terminale e del suo nucleo familiare: un numero sempre più consistente di studi ha sottolineato l'utilità di associare alle terapie tumorali anche le cure palliative, ottenendo benefici in termini di qualità di vita e in alcuni casi anche di aumenti della sopravvivenza per questi pazienti (2).



## OBIETTIVO DELLO STUDIO

Nell'ultimo decennio diagnosi e terapia del NSCLC si sono basati molto sui biomarkers rilevati a partire da biopsie liquide e solide e in particolare le tecniche *Next Generation Sequencing* (NGS) hanno aperto la cosiddetta “*genomic era*” nella ricerca e pratica clinica oncologica, permettendo un significativo passo in avanti nell'ambito della medicina personalizzata. Il principale vantaggio di questi pannelli molecolari è quello di permettere una simultanea analisi di tutte le principali alterazioni molecolari target, quali le mutazioni di *EGFR*, *BRAF*, *KRAS* e i riarrangiamenti di *ALK*, *ROS1* e *NTRK1/2/3*, in un'unica seduta analitica a partire da campioni tissutali e/o biopsie liquide.

La descrizione dell'applicazione delle metodiche di NGS e delle implicazioni diagnostico-terapeutiche nella reale pratica clinica si è dunque resa necessaria e utile al fine di ottimizzarne l'utilizzo in oncologia.

In questo studio retrospettivo è stato analizzato l'utilizzo, nell'ambito di protocolli di pratica clinica e dei trial clinici ROME, RATIONAL e VISION, di vari pannelli NGS (kit di analisi FoundationOne, Avenio, Myriapod, Guardant360, Archer e Oncomine) all'interno di un gruppo di pazienti affetti da tumore del polmone non a piccole cellule in stadio avanzato/metastatico (III/IV) riferiti all'Unità Operativa di Oncologia 2, presso l'Istituto Oncologico Veneto (IOV).

L'obiettivo primario era quello di descrivere tempistica ed indicazione clinica all'esecuzione dell'analisi NGS nella reale pratica clinica, con particolare riferimento al momento della storia di malattia oncologica (diagnosi o alla progressione di malattia dopo una o più linee di terapia precedenti), e scelta del campione biologico su cui effettuare il test (plasma o tessuto tumorale).

Obiettivo secondario è stata la valutazione dell'impatto sulla scelta terapeutica derivato dal risultato del test NGS: in particolare su quanti venivano rilevate alterazioni molecolari *druggable* e quanti poi iniziavano una terapia mirata specifica per questa alterazione. Infine, è stato descritto l'impatto di tale scelta terapeutica sulla sopravvivenza dei pazienti oggetto di studio.



# MATERIALI E METODI

## 1. Popolazione di pazienti

Lo studio osservazionale retrospettivo oggetto della presente tesi ha incluso pazienti affetti da tumore polmonare non a piccole cellule in stadio avanzato o metastatico, in cui sia stato ritenuto indicato l'utilizzo dei pannelli molecolari NGS nell'ambito dell'ordinaria pratica clinica e nell'ambito di tre trial clinici (RATIONAL, ROME e VISION) aperti ad arruolamento presso l'UO di Oncologia 2 dello IOV nel periodo di interesse.

Sono stati inizialmente considerati per lo studio i pazienti affetti da malattia oncologica in stadio avanzato che tra dicembre 2017 e luglio 2022 hanno eseguito, a seguito di un'adeguata valutazione clinica presso l'Istituto Oncologico Veneto (IOV), almeno un (e massimo due) test NGS, su plasma o su tessuto, per la determinazione del profilo molecolare della patologia. Tra questi, sono stati selezionati i pazienti affetti da NSCLC, escludendo i casi che presentavano neoplasie diverse da quella polmonare non a piccole cellule.

I criteri d'inclusione nello studio erano quindi: diagnosi istologica di NSCLC; diagnosi clinica di stadio avanzato di malattia, quindi stadi III e IV secondo i criteri definiti dall'ottava edizione della classificazione TNM; aver eseguito almeno un (e massimo di due, raccolti in ordine cronologico) test NGS su plasma o su tessuto (da biopsia chirurgica o da prelievo tissutale mininvasivo endoscopico o transcutaneo), per la profilazione molecolare della malattia oncologica; il test NGS poteva essere somministrato all'interno dei protocolli di ordinaria pratica clinica dello IOV o all'interno di uno dei tre trial clinici presi in esame (RATIONAL, ROME e VISION). I criteri di esclusione erano: l'avere una neoplasia non NSCLC non in stadio avanzato (stadi III/IV secondo l'ottava edizione della classificazione TNM) e non aver ricevuto almeno un test NGS.

Lo studio RATIONAL (Registro Nazionale delle Mutazioni "Actionable") è uno studio osservazionale non interventistico multicentrico che ha come obiettivo primario quello di descrivere la frequenza di mutazioni *actionable* in una

popolazione di pazienti che hanno ricevuto una caratterizzazione genetico-molecolare con test NGS su tessuto tumorale.

Lo studio ROME è un trial clinico randomizzato, prospettico e multicentrico che studia in una popolazione di soggetti con progressione (ricidiva/metastasi) di malattia oncologica in varie sedi (seno, tratto GI, polmone, etc.) l'efficacia (intesa come Overall Response Rate, ORR) del trattamento Standard of Care (SoC) contro quella della terapia personalizzata sulle caratteristiche genomiche del singolo paziente.

Lo studio VISION è un trial clinico prospettico interventistico che offre un pre-screening genetico con test NGS su tessuto e/o plasma, al fine di identificare pazienti con NSCLC portatori delle amplificazioni del gene MET o delle alterazioni *skipping* del suo esone 14, suscettibili di trattamento con Tepotinib; gli endpoint primari di tale studio sono l'attività e tollerabilità di Tepotinib.

Di questi pazienti sono state raccolte le caratteristiche cliniche, quali il genere, la data di nascita e l'età alla diagnosi di malattia avanzata. Sono state inoltre raccolte le caratteristiche istopatologiche della malattia oncologica, quali l'istotipo del tumore primitivo non a piccole cellule e l'espressione di biomarcatori tissutali rilevati con test molecolari non-NGS prima del test NGS stesso, tra cui lo status mutazionale di *EGFR*, *BRAF* e *KRAS* e i riarrangiamenti di *ALK*, *ROS1* e *NTRK* e il grado di espressione di PD-L1. È stato raccolto il timing di accesso al test NGS, alla diagnosi o dopo progressione di malattia. Inoltre, per i pazienti che hanno svolto il test dopo progressione, sono state raccolte le informazioni su tutte le linee di trattamento ricevute prima di accedere al test NGS. Sono state anche raccolte le tempistiche intercorse tra diagnosi di malattia avanzata e prima visita oncologica con firma del consenso informato all'esecuzione del test NGS (con eventuale reclutamento nei trial clinici), tra visita oncologica (con eventuale reclutamento nei trial clinici) e accettazione da parte del laboratorio del campione da analizzare, tra accettazione del campione e refertazione del test e tra visita oncologica e refertazione del test NGS. Infine, è stata raccolta l'informazione dello status del paziente (vivo/deceduto) all'ultima visita registrata allo IOV, per la valutazione della sopravvivenza in relazione alla terapia ricevuta dopo test NGS.

## 2. Pannelli NGS

Sono stati utilizzati diversi tipi di pannelli NGS per la ricerca di alterazioni *druggable* o *actionable* nei pazienti in studio. I kit utilizzati sono di seguito elencati, descrivendone le caratteristiche tecniche principali. In particolare, i kit Avenio® ctDNA Expanded Panel e Myriapod® NGS Cancer Panel DNA (NG 033 panel) sono stati utilizzati nel corso dell'ordinaria pratica clinica, presso il laboratorio di Immunologia e Diagnostica Molecolare Oncologica dell'Istituto Oncologico Veneto; il kit FoundationOne®CDx è stato usato nell'ambito degli studi RATIONAL e ROME (in cui è stato usato anche il kit FoundationOne® Liquid CDx), mentre i kit Guardant360® e Archer® Reveal ctDNA™ sono stati usati nell'ambito del protocollo dello studio VISION. Il kit Ion Torrent™ OncoPrint™ Focus Assay è stato utilizzato per un paziente durante la pratica clinica e per un altro paziente nell'ambito sempre dello studio VISION.

Il FoundationOne®CDx (F1CDx) è un dispositivo diagnostico in vitro basato sul sequenziamento di nuova generazione, destinato alla rilevazione di sostituzioni, alterazioni di inserzione e delezione e alterazioni del numero di copie in 324 geni e alcuni riarrangiamenti genici, nonché delle firme genomiche, compresa l'instabilità dei microsatelliti e del carico mutazionale del tumore (tumor mutational burden, TMB) utilizzando DNA isolato da campioni di tessuto tumorale fissati in formalina e inclusi in paraffina. La piattaforma F1CDx utilizza il DNA estratto da tessuto tumorale FFPE per la preparazione di librerie dell'intero genoma, prima del sequenziamento sulla piattaforma Illumina® HiSeq 4000. Dopo il sequenziamento, viene utilizzato un software personalizzato per determinare le varianti genomiche, compresi sostituzioni, indels, *Copy Number Variations*, riarrangiamenti genomici, instabilità dei microsatelliti e TMB. I risultati generati dal test comprendono: le indicazioni del test diagnostico associato (CDx), le mutazioni del tumore con evidenza di significatività clinica e le mutazioni del tumore con significatività clinica potenziale.

Il test FoundationOne® Liquid CDx è un dispositivo diagnostico di laboratorio basato sul sequenziamento di nuova generazione, che usa il cfDNA isolato da plasma, estratto dal sangue periferico di pazienti con patologia oncologica solida. Vengono quindi preparate librerie dell'intero genoma, prima del sequenziamento sulla piattaforma NovaSeq® 6000. Dopo il sequenziamento, viene utilizzato un

software personalizzato per determinare le varianti genomiche, compresi sostituzioni, indels, *Copy Number Variations*, riarrangiamenti genomici, instabilità dei microsatelliti e TMB. I risultati generati dal test comprendono: le indicazioni del test diagnostico associato (CDx), le mutazioni del tumore con evidenza di significatività clinica e le mutazioni del tumore con significatività clinica potenziale.

Il kit Avenio® ctDNA Expanded Panel è un test RUO che permette la preparazione di librerie NGS, a partire da DNA estratto da plasma, compatibili con la piattaforma Illumina NextSeq per l'analisi di diversi tipi di varianti genetiche quali inserzioni/delezioni, mutazioni puntiformi, fusioni e amplificazioni geniche in 77 geni inclusi nelle linee guida dell'U.S. NCCN (*National Comprehensive Cancer Network*). L'Avenio Oncology Analysis Software analizza i dati, classificando le alterazioni rilevate secondo le definizioni dei database COSMIC, VARSOME e CLINVAR. È un test molecolare ottimizzato soprattutto per l'iter diagnostico-terapeutico del tumore del polmone, della mammella e del colon-retto.

Il kit Myriapod® NGS Cancer Panel DNA (NG 033 panel) permette la ricerca di mutazioni somatiche in DNA estratto da tessuto tumorale FFPE o da cfDNA isolato da plasma tramite sequenziamento di nuova generazione; il kit Myriapod NGS Cancer Panel DNA (NG 033 panel) permette la preparazione di librerie NGS compatibili con la piattaforma Illumina Miseq per l'analisi delle mutazioni hotspot in 16 geni le cui alterazioni possono avere una rilevanza clinica. Per l'analisi dei dati rilevati viene usato il sistema integrato Myriapod NGS Data Anaysis Software versione 5.0.0 e la Myriapod NGS Workstation.

Il pannello NGS Guardant360® sequenzia 73 geni per identificare con alta sensibilità alterazioni somatiche cancro-correlate. Il test usa cfDNA estratto da plasma e le alterazioni genetiche sono analizzate tramite l'amplificazione di specifiche regioni target e tramite un successivo sequenziamento in parallelo usando le piattaforme Illumina. Il test Guardant360 è in grado di rilevare mutazioni puntiformi, amplificazioni, fusioni, brevi inserzioni/delezioni e alterazioni del sito di splicing dei geni che prende in esame.

L'Archer® Reveal ctDNA™ è un test NGS basato su ampliconi che usa il cfDNA estratto da plasma per analizzare le alterazioni nelle regioni hotspot in 28 geni,



preparando librerie compatibili con la piattaforma Illumina MiSeq e individuando nei geni target mutazioni puntiformi e brevi inserzioni/delezioni.

Il test Ion Torrent™ Oncomine™ Focus Assay è un pannello NGS che permette la rilevazione di varianti genetiche in 52 geni cancro-correlati. Questo test permette la simultanea analisi di DNA e RNA estratti da tessuto per individuare in un'unica seduta le varie alterazioni nelle regioni hotspot, tra cui mutazioni puntiformi, inserzioni/delezioni, *Copy Number Variations* e fusioni geniche. Il test Oncomine™ Focus è un test NGS basato su ampliconi ed è compatibile con il sistema d'analisi Ion PGM™ System, ma anche con altre piattaforme di sequenziamento Ion Torrent™.

### 3. Analisi statistica

L'obiettivo primario di questa tesi è quello di descrivere l'utilizzo dei pannelli NGS nell'iter diagnostico e terapeutico dei pazienti con tumore polmonare non a piccole cellule.

Sono state analizzate e descritte le caratteristiche anagrafiche dei pazienti, ovvero sesso ed età mediana alla diagnosi di malattia avanzata, con primo (Q1) e terzo (Q3) quartile, descrivendo poi le frequenze dei vari istotipi di NSCLC trovati nei pazienti. È stata eseguita un'analisi dell'assetto molecolare basale dei pazienti, prima che accedessero al test NGS, descrivendo la frequenza di richiesta dei test molecolari per le alterazioni di *ALK*, *EGFR*, *ROS1*, *BRAF*, *KRAS*, *RET*, *MET*, *HER2*, *NTRK* e per i livelli di espressioni di PD-L1, calcolando anche il numero dei pazienti in cui sono state rilevate alterazioni *druggable* che poi hanno avuto accesso a una terapia target. La sopravvivenza complessiva (OS) è stata definita come tempo dalla diagnosi di malattia avanzata alla data di morte per qualsiasi causa o alla data di ultimo follow-up. È stata riportata la sopravvivenza complessiva mediana (mOS) calcolata con il metodo di Kaplan-Meier.

Sono state poi riportate la proporzione di pazienti che accedevano al test alla diagnosi o alla progressione di malattia (per quest'ultimi calcolando la mediana delle linee di terapia sistemica eseguite prima dell'NGS), il tipo di prelievo (biopsia liquida/tissutale), la modalità di accesso al test NGS (pratica clinica/trial clinico) e il tipo di kit utilizzato. Sono state valutate mediante analisi di Kaplan-Meier le

tempistiche dalla visita in cui è stato proposto il test al referto dell'NGS (calcolando anche giorni tra visita e accettazione del campione in laboratorio e tra accettazione e uscita del referto); è stata riportata la mediana con l'intervallo di confidenza al 95% (95%CI); inoltre si sono confrontate tramite log-rank test le tempistiche in base al tipo di prelievo (biopsia liquida/tissutale), in base alla modalità di accesso al test (pratica clinica/protocollo di studio) e in base al protocollo di studio specifico (RATIONAL/ROME/VISION). Si è proceduto alla descrizione delle frequenze dei risultati del primo NGS, distinguendoli in:

- *Druggable*, se veniva individuata un *oncogene addiction* che poteva essere candidabile a terapia target;
- *Non druggable*, se le alterazioni individuate non consentivano l'invio del paziente alla terapia target;
- *Failed*, se non si potevano eseguire le analisi molecolari a causa di materiale insufficiente o deperito;
- *Negative*, se non veniva rilevata alcuna alterazione con frequenza allelica significativa.

È stata poi valutata l'influenza di tali risultati sull'iter terapeutico dei pazienti.

Per il secondo test NGS, sono stati distinti i pazienti che hanno eseguito la seconda analisi in sincronia con la prima (analisi NGS su tessuto e su plasma) dai pazienti che l'hanno eseguita successivamente alla prima. Per i pazienti con il secondo prelievo in sincrono, è stata descritta la frequenza dei risultati del secondo test ed è stata valutata la correlazione dei risultati tra il primo e il secondo test NGS mediante test chi-quadrato ( $\chi^2$ ). Per i pazienti con seconda analisi eseguita successivamente alla prima, che accedevano al test in progressione di malattia, è stata calcolata la mediana delle linee di terapia sistemica eseguite prima dell'NGS ed è stata descritta la frequenza del tipo di prelievo scelto (biopsia liquida/tissutale), della modalità di accesso al test NGS (pratica clinica/protocollo di studio) e del tipo di kit utilizzato. È stata eseguita un'analisi di Kaplan-Meier (riportando la mediana con il 95%CI) e il confronto mediante log-rank test del tempo dalla visita in cui è stato proposto il test al referto dell'NGS (calcolando anche giorni tra visita e accettazione del campione in laboratorio e tra accettazione e uscita del referto): in particolare si sono confrontate le tempistiche in base al tipo di prelievo (biopsia liquida/tissutale), in base alla modalità di accesso al test (pratica clinica/protocollo di studio) e in base al protocollo di studio specifico applicato (RATIONAL/ROME/VISION). Sono

state quindi descritte le frequenze dei risultati del secondo NGS, distinguendoli in Druggable/Non druggable/Negativo/Failed e si è valutato l'influenza di tali risultati sul successivo iter terapeutico dei pazienti.

Infine, costruendo le curve di Kaplan-Meier, si sono confrontate mediante log-rank test le sopravvivenze dei pazienti che hanno ricevuto una terapia target e i pazienti che non l'hanno ricevuta in seguito all'esito dei test molecolari basali e dei pannelli NGS.

Per le analisi statistiche la soglia di significatività è stata posta a  $p = 0,05$  ed è stato utilizzato il software R (versione 4.0.5, The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).



# RISULTATI

## 1. Caratteristiche cliniche e patologiche dei pazienti

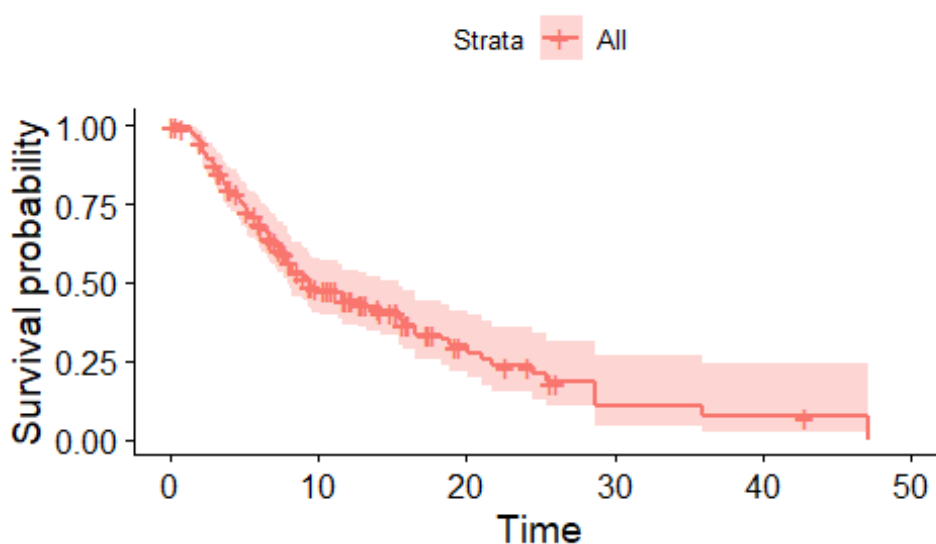
Le caratteristiche clinico-patologiche della popolazione in studio sono riassunte nella **tabella IV**. Dei 193 pazienti che sono stati sottoposti a test NGS su tessuto neoplastico o su plasma, alla diagnosi o in progressione di malattia nel periodo di interesse, 153 erano affetti da NSCLC in stadio avanzato (stadi III/IV). All'interno della popolazione di pazienti in studio vi sono 84 (54.9%) maschi e 69 (45.1%) femmine. La mediana dell'età alla diagnosi di malattia avanzata è di 66 anni (Q1=57; Q3=74). La maggior parte dei pazienti presenta una diagnosi di NSCLC a istotipo di adenocarcinoma (n=118; 77.12%); gli altri pazienti hanno una diagnosi di carcinoma a cellule squamose (n=16; 10.46%), di carcinoma NOS (n=6; 3.92%), di carcinoma adenoidocistico (n=3; 1.96%), di carcinoma adenosquamoso (n=2; 1.31%), di carcinoma sarcomatoide (n=2; 1.31%), di carcinoma scarsamente differenziato (n=2; 1.31%), adenocarcinoma mucinoso (n=1; 0.65%), di carcinoma a grandi cellule (n=1; 0.65%), di carcinoma mucinoso (n=1; 0.65%) o di carcinoma pleomorfo (n=1; 0.65%). In alcuni pazienti è stata fatta una prima valutazione molecolare al basale dei geni di *EGFR*, *ALK*, *ROS1*, *BRAF*, *KRAS*, *RET*, *MET*, *HER2*, *NTRK* e PD-L1 con test non-NGS. Nello specifico si è valutato lo stato mutazionale di *EGFR* in 133 pazienti (86.93%), di *BRAF* in 21 pazienti (13.73%), di *KRAS* di 30 pazienti (19.61%); sono stati anche ricercati i riarrangiamenti di *ALK* in 130 pazienti (84.97%), di *ROS1* in 119 pazienti (77.78%) e di *NTRK* in un unico paziente (0.65%); infine si sono valutate anche le alterazioni molecolari di *RET* in 9 pazienti (5.88%), di *MET* in 13 pazienti (8.5%) e di *HER2* in 3 pazienti (1.96%). È stata eseguita una misura dei livelli di espressione di PD-L1 in 141 pazienti su 153, con una mediana di espressione dello 0% (Q1=0%; Q3=45%). A seguito di queste valutazioni al basale sono state individuate delle alterazioni driver druggable in 20 pazienti: 16 pazienti con mutazioni di *EGFR*, 2 con mutazioni di *KRAS*, un paziente con una mutazione di *BRAF* e uno con un riarrangiamento di *ALK*. I pazienti con alterazioni *druggable* sono stati quindi sottoposti a terapia target secondo le linee guida correnti.

**Tabella IV. Caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti**

<b>Variabili</b>	<b>N</b>	<b>(%)</b>
<b>Numero casi</b>	153	(100)
<b>Genere</b>		
M	84	(54.9)
F	69	(45.1)
<b>Età alla diagnosi di malattia avanzata (in anni)</b>		
Mediana (Q1-Q3)	66	(57-74)
<b>Overall Survival (mesi)</b>		
Mediana (intervallo di confidenza al 95%)	9.4	(7.9-15.4)
<b>Istologia</b>		
Adenocarcinoma	118	(77.12)
CCS	16	(10.46)
NOS	6	(3.92)
Adenoidocistico	3	(1.96)
Adenosquamoso	2	(1.31)
Sarcomatoide	2	(1.31)
Scarsamente differenziato	2	(1.31)
Adenocarcinoma mucinoso	1	(0.65)
CGC	1	(0.65)
Mucinoso	1	(0.65)
Pleomorfo	1	(0.65)
<b>Analisi molecolari al basale</b>		
<b>Valutazione stato di EGFR</b>	133	(86.93)
Alterazioni driver	16	(10.46)
<b>Valutazione stato di ALK</b>	130	(84.97)
Alterazioni driver	1	(0.65)
<b>Valutazione stato di ROS1</b>	119	(77.78)
Alterazioni driver	0	(0)
<b>Valutazione stato di BRAF</b>	21	(13.73)
Alterazioni driver	1	(0.65)
<b>Valutazione stato di KRAS</b>	30	(19.61)
Alterazioni driver	2	(1.31)
<b>Valutazione stato di RET</b>	9	(5.88)
Alterazioni driver	0	(0)
<b>Valutazione stato di MET</b>	13	(8.5)
Alterazioni driver	0	(0)
<b>Valutazione stato di HER2</b>	3	(1.96)
Alterazioni driver	0	(0)
<b>Valutazione stato di NTRK</b>	1	(0.65)

Alterazioni driver	0	(0)
<b>Valutazione livello di espressione di PD-L1 (in percentuale)</b>		
Mediana (Q1-Q3)	0	(0-45)
<b>Terapie target vs alterazioni driver al basale</b>		
Si	18	(11.76)
No	2	(1.31)

La sopravvivenza mediana della popolazione presa in analisi è stata di 9.4 mesi (IC95% 7.9-15.4). Al termine del periodo considerato per l'analisi statistica 94 (61.43%) pazienti erano deceduti (**Figura 7**).



*Figura 7. Curva di Kaplan-Meier per sopravvivenza globale della popolazione in studio.*

## 2. Prima analisi NGS

Dei 153 pazienti analizzati, tutti hanno eseguito almeno una analisi NGS. Nello specifico 52 (34%) pazienti hanno avuto accesso al test alla diagnosi di malattia, mentre 101 (66%) pazienti l'hanno eseguito al momento della progressione di malattia (**Tabella V**).

**Tabella V.** Distribuzione richieste NGS alla diagnosi o in progressione di malattia

Variabili	N	(%)
<b>Numero casi</b>	153	(100)
<b>NGS alla diagnosi di malattia</b>	52	(34)
NGS in parallelo ad altri test molecolari	12	(7.84)
<b>NGS in progressione di malattia</b>	101	(66)
Mediana linee terapeutiche precedenti (intervallo)	2	(1-2)

Tra i pazienti che l'hanno ricevuto alla diagnosi, per tre (1.96%) pazienti la richiesta per il test NGS è stata inviata in contemporanea a quella per test molecolari non NGS, utilizzando per la caratterizzazione molecolare dei malati i pannelli NGS in parallelo ai test molecolari tradizionali per la ricerca delle alterazioni dei geni driver del tumore polmonare. In un paziente le analisi molecolari basali hanno individuato una sostituzione della leucina 858 dell'esone 21 del gene di *EGFR* (L858R), alterazione poi ritrovata anche all'NGS; negli altri due pazienti le analisi basali non hanno individuato alterazioni target, mentre l'NGS ha rilevato delle sostituzioni della glicina 12 dell'esone 2 del gene di *KRAS* (G12C-A). I dati sono riassunti nella **Tabella VI**.

**Tabella VI.** Confronto dei risultati ottenuti dalle analisi molecolari tradizionali e dall'NGS in tre pazienti che hanno ricevuto le due tipologie di test in parallelo alla diagnosi di malattia avanzata.

	<b>Analisi molecolari basali (ALK, EGFR, ROS1)</b>	<b>Analisi NGS</b>
<b>Paziente 1</b>	Mut ex 21 EGFR (p.L858R)	Mut ex 21 EGFR (p.L858R)
<b>Paziente 2</b>	-	Mut ex 2 KRAS (p.G12C)
<b>Paziente 3</b>	-	Mut ex 2 KRAS (p.G12A)

I 101 pazienti in progressione di malattia hanno potuto accedere al test NGS dopo una media di due linee chemioterapiche fallite (mediana=2; Q1=1; Q3=2) (**Tabella V**).



## a. Iter diagnostico

I pazienti hanno potuto accedere al test NGS presso l'Istituto Oncologico Veneto tramite l'ordinaria pratica clinica (n=51; 33.33%) o tramite diversi protocolli di studio clinico (n=101; 66.02%); nello specifico sono stati inclusi 82 pazienti arruolati nel trial RATIONAL (53.59%), 13 pazienti reclutati nel trial VISION (8.5%) e 6 pazienti nel trial ROME (3.92%). Per un singolo paziente manca il dato tramite cui ha avuto accesso al primo test NGS. In 58 (37.91%) pazienti si è usata per l'analisi la biopsia liquida, mentre per i restanti 95 (62.09%) pazienti si è studiato il campione tissutale, prelevato alla prima diagnosi della malattia o in un momento successivo nella storia del paziente. I dati sopraesposti sono riassunti nella **Tabella VII**.

**Tabella VII.** *Distinzione pazienti per tipologia di accesso al test NGS e tipo di prelievo analizzato*

<b>Variabili</b>	<b>N</b>	<b>(%)</b>
<b>Numero casi</b>	153	(100)
<b>Tipologia di accesso</b>		
Pratica clinica	51	(33.33)
Protocollo di studio	101	(66.02)
Non noto	1	(0.65)
<b>Tipo di prelievo</b>		
Biopsia liquida	58	(37.91)
Biopsia tissutale	95	(62.09)

Le caratteristiche dei pannelli NGS impiegati sono già state descritte nel rispettivo paragrafo di "Materiali e Metodi". Nella pratica clinica sono stati usati per l'analisi dei campioni di plasma i kit Avenio® ctDNA Expanded Panel (n=40; 26.14%) e il kit Myriapod® NGS Cancer Panel DNA (NG 033 panel) (n=2; 1.31%), mentre per l'analisi dei campioni tissutali si è utilizzato per un paziente il kit Ion Torrent™ Oncomine™ Focus Assay (0.65%) e per i restanti otto il kit Myriapod® NGS Cancer Panel DNA (NG 033 panel) (5.23%). Nell'ambito dei trial clinici sono stati adottati per l'analisi delle biopsie liquide i kit Guardant360® (n=9; 5.88%), il kit Archer® Reveal ctDNA™ (n=3; 1.96%) e il kit FoundationOne® Liquid CDx (n=3; 1.96%), mentre per l'analisi dei campioni tissutali si sono impiegati i kit Ion Torrent™ Oncomine™ Focus Assay (n=1, 0.65%) e il kit FoundationOne®CDx

(F1CDx) (n=85, 55.56%). Per il paziente con accesso al test non noto, è stato usato il kit FoundationOne® Liquid CDx (0.65%).

Le tempistiche intercorse sono state misurate in giorni, calcolando quanto tempo è passato tra la data della prima visita oncologica in cui è stato proposto il test NGS e la data di accettazione del campione nel laboratorio (media=24.41 giorni; mediana=15.5 giorni), quanto tempo è passato tra la data di accettazione e la data di refertazione del test NGS (media=20.44 giorni; mediana=12 giorni) e, infine, quanto tempo è passato tra la data della prima visita oncologica e la data di refertazione del test NGS (aspetto di maggior interesse per i pazienti) (media=44.95 giorni; mediana=35.5 giorni) (vedi **Figura 8**).

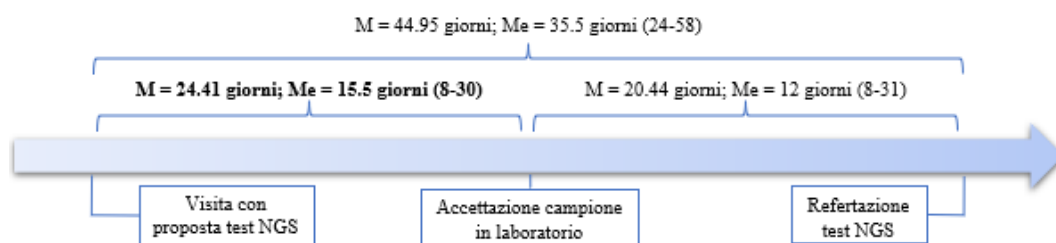


Figura 8. Tempistiche di accettazione e refertazione del primo test NGS; M=media; Me=mediana; Q1 e Q3 riportati tra parentesi.

Tramite *log-rank* test si sono confrontate le tempistiche tra prima visita e refertazione in base al tipo di prelievo, se biopsia liquida o tissutale, trovando per la prima un'attesa mediana di circa 39 giorni (95%CI 34-55 giorni) e per la seconda una mediana di 31 giorni (95%CI 28-38 giorni), con un valore di  $p=0.199$  non significativo (vedi **Tabella VIII**). Quindi, l'utilizzo di una tipologia di campione rispetto a un'altra non portava a rilevanti differenze nelle tempistiche con cui il paziente riceveva il referto del test. Andando poi a valutare le singole tempistiche per i diversi tipi di campione tra la prima visita e l'accettazione del campione in laboratorio si ha un'attesa mediana di 8 giorni (95%CI 6-11 giorni) per le biopsie liquide e una mediana di 19.5 giorni (95%CI 16-24 giorni) per le biopsie solide, differenza statisticamente significativa ( $p<0.001$ ). Il tempo mediano tra accettazione e refertazione è significativamente diverso tra campioni liquidi (30 giorni, 95%CI 26-37 giorni) e quelli solidi (10 giorni, 95%CI 8-11 giorni,  $p<0.001$ ).

**Tabella VIII.** Intervallo di tempo tra prima visita e refertazione del test NGS, distinto per tipo di prelievo (biopsia liquida o tissutale)

	<b>N (pz)</b>	<b>Mediana (giorni)</b>	<b>Lower 95%CI (giorni)</b>	<b>Upper 95%CI (giorni)</b>
<b>Tutti i pazienti</b>	153	35.5	31	41
<b>Biopsia liquida</b>	58	39	34	55
<b>Biopsia tissutale</b>	95	31.5	28	38
<b>p=0.199</b>				

Lo stesso test statistico *log-rank* è stato poi applicato distinguendo i pazienti per tipo di accesso, se con ordinaria pratica clinica o tramite trial: in questo caso si è vista un'attesa mediana di circa 49 giorni (95%CI 41-64 giorni) nell'ambito clinico, contro i soli 29 giorni (95%CI 26-35 giorni) nell'ambito dei trial, con un valore statisticamente significativo ( $p<0.001$ ) (vedi **Tabella XI**). L'attesa mediana tra visita e accettazione del campione in laboratorio è di 9 giorni (95%CI 6-15 giorni) nella pratica clinica e di 17 giorni (95%CI 15-21 giorni) nei protocolli di studio, differenza non significativa ( $p=0.125$ ). L'attesa mediana tra l'accettazione e la refertazione è di 33 giorni (95%CI 31-42 giorni) nella pratica clinica e di 10 giorni (95%CI 9-11 giorni) nei protocolli di studio, differenza statisticamente significativa ( $p<0.001$ ).

L'analisi multivariata condotta per il tempo accettazione-refertazione ha mostrato una correlazione statisticamente significativa solo per il tipo di accesso ( $p=8\times 10^{-7}$ ), e non per il tipo di prelievo ( $p=0.28$ ).

Questi dati suggeriscono quindi una maggior rapidità di analisi dei laboratori associati ai trial rispetto ai comuni centri di analisi ospedalieri, nonostante il maggior tempo impiegato nei trial per il transito del campione dall'ospedale al laboratorio di riferimento.

**Tabella XI.** Tempistiche distinte per tipo di accesso (pratica clinica o protocollo di studio)

	<b>N (pz)</b>	<b>Mediana (giorni)</b>	<b>Lower 95%CI (giorni)</b>	<b>Upper 95%CI (giorni)</b>
<b>Prima visita - Accettazione</b>				
Tutti i pazienti	153	15	13	18

Pratica clinica	51	9	6	15
Protocollo di studio	101	17	15	21
<b>p=0.125</b>				
<b>Accettazione - Referto</b>				
Tutti i pazienti	153	12	11	16
Pratica clinica	51	<b>33</b>	31	42
Protocollo di studio	101	<b>10</b>	9	11
<b>p&lt;0.001</b>				
<b>Prima visita - Referto</b>				
Tutti i pazienti	153	35	31	41
Pratica clinica	51	<b>49</b>	41	64
Protocollo di studio	101	<b>29</b>	26	35
<b>p&lt;0.001</b>				

## b. Iter terapeutico

Dei 153 pazienti che hanno eseguito un primo test NGS, 35 test (22.88%) hanno dato un risultato *druggable*, 76 test (49.67%) *non druggable*, 16 test (*negative*, 10.46%) non hanno rilevato alcuna alterazione di significato clinico e 26 (*failed*, 16.99%) test sono falliti. Dei 35 pazienti riportanti alterazioni *druggable* come risultato del test NGS, 13 (37.14%) hanno poi ricevuto una terapia target, di cui 9 pazienti tramite i protocolli standard, 3 pazienti hanno ricevuto il farmaco off-label e un paziente vi ha avuto accesso tramite un trial clinico. Per capire meglio come è stato usato il test NGS nel processo decisionale terapeutico, si è andati a distinguere tre diversi scenari:

1. si è atteso il risultato del test NGS prima di iniziare una nuova terapia;
2. è stata somministrata un'altra linea terapeutica prima dell'arrivo del risultato del test NGS, per poi modificare il farmaco assegnato;
3. è stata somministrata un'altra linea terapeutica prima dell'arrivo del risultato del test NGS, per poi continuare con il farmaco assegnato precedentemente fino a progressione di malattia.

Dei 13 pazienti che hanno ricevuto una terapia target dopo l'esito del test NGS, 6 hanno seguito il primo scenario, 4 il secondo e 3 il terzo come riassunto nella **Tabella X**.

**Tabella X.** *Influenza del risultato del primo test NGS nell'iter terapeutico dei pazienti.*

<b>Variabili</b>	<b>N</b>	<b>(%)</b>
<b>Numero casi</b>	13	(100)
<b>Scenario n° 1</b>	6	(46.15)
<b>Scenario n° 2</b>	4	(30.77)
<b>Scenario n° 3</b>	3	(23.08)

I restanti 22 pazienti non hanno ricevuto una terapia mirata per i seguenti motivi:

- perdita del paziente nel corso del follow-up, per cui manca l'informazione riguardante il loro protocollo terapeutico (n=7; 31.81%);
- scadimento delle condizioni del paziente poco dopo l'arrivo del risultato e impossibilità a iniziare la terapia (n=2; 9.09%);
- l'alterazione *druggable* trovata con il test NGS corrispondeva a quella trovata con i test molecolari basali, per cui era già stata iniziata una target therapy, che risultava ancora efficace o aveva già fallito con progressione della malattia (n=6; 27.27%);
- secondo le linee guida correnti o gli studi clinici disponibili al tempo dell'analisi l'alterazione *druggable* trovata con il test NGS permetteva l'accesso alla terapia target solo dopo fallimento di una prima linea terapeutica e/o progressione di malattia (n=7; 31.81%).

L'iter seguito in questa fase è riassunto nella **Figure 9 e 10**.

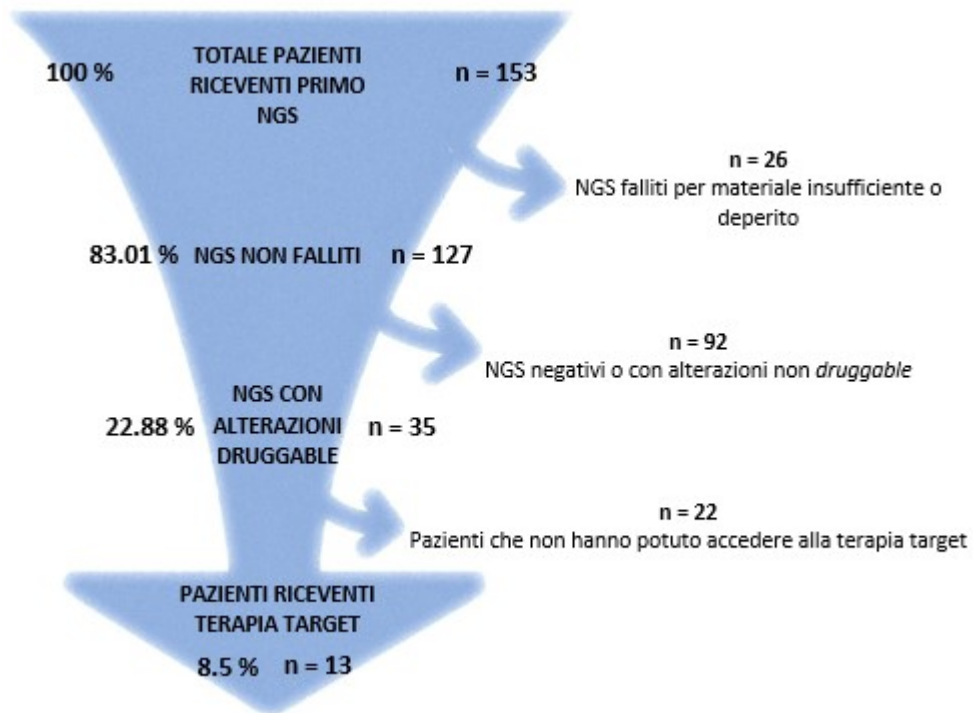


Figura 9. Il grafico mostra il percorso dei pazienti dal primo test NGS all'inizio della terapia target: inizialmente sono stati inclusi 153 pazienti che hanno eseguito il test, sono quindi stati esclusi 118 test falliti, negativi o che non riportavano alterazioni druggable; infine 22 pazienti non hanno potuto accedere alla terapia target perché perso in follow-up, deceduti, già trattati con farmaci mirati o non includibili nei protocolli terapeutici.



Figura 10. Modalità con cui i 13 pazienti hanno avuto accesso alla terapia target in seguito al primo test NGS.

### 3. Seconda analisi NGS

#### a. NGS sincroni

Dei 153 pazienti che sono stati reclutati in questo studio, 42 hanno eseguito anche un secondo test NGS: per 9 di quest'ultimi pazienti i due test NGS, uno su biopsia liquida e l'altro su biopsia solida, sono stati richiesti in contemporanea. Due pazienti hanno eseguito i test direttamente alla diagnosi di malattia avanzata, mentre gli altri sette erano in progressione di malattia dopo aver già ricevuto altre linee terapeutiche (mediana=1; Q1=1; Q3=2). I pazienti hanno potuto accedere secondo diverse modalità: un paziente li ha eseguiti entrambi nell'ambito dell'ordinaria pratica clinica, tre pazienti hanno eseguito il test su biopsia liquida nell'ambito del protocollo VISION e il test su biopsia solida con lo studio RATIONAL, un paziente ha eseguito il test su biopsia liquida in pratica clinica e il test su biopsia solida tramite il protocollo RATIONAL, tre pazienti hanno eseguito entrambi i test nell'ambito dello studio ROME e l'ultimo paziente entrambi all'interno del protocollo di studio VISION. Per i test richiesti in pratica clinica, si sono usati i kit Avenio® ctDNA Expanded Panel per le analisi su plasma e Myriapod® NGS Cancer Panel DNA (NG 033 panel) per quelle su tessuto. Nel trial RATIONAL il kit FoundationOne®CDx (F1CDx), nel trial ROME i kit FoundationOne® Liquid CDx per le analisi su plasma e FoundationOne®CDx (F1CDx) per le analisi su tessuto e nel protocollo di studio VISION sono stati usati i kit Archer® Reveal ctDNA™ per le biopsie liquide e Ion Torrent™ OncoPrint™ Focus Assay per quelle solide.

In due pazienti entrambi i test hanno rilevato un'alterazione *druggable*, in due l'NGS su tessuto è fallito e quello su plasma è risultato negativo, in un paziente il test su campione solido è risultato negativo e quello su biopsia liquida ha rilevato un'alterazione *non druggable*, viceversa in un altro paziente e nei restanti tre c'è stato un risultato concorde per delle alterazioni *non druggable*.

Si è valutata l'associazione dei risultati tra il test NGS tissutale e il test NGS su biopsia liquida, ottenendo una correlazione statisticamente significativa (test chi-quadrato,  $p = 0.0289$ ) (**Tabella XI**).

**Tabella XI.** Correlazione tra i risultati degli NGS sincroni su biopsia liquida e solida

	<b>Risultato biopsia liquida</b>	Druggable	Negative	Non druggable	Totale
<b>Risultato biopsia solida</b>					
Druggable		2 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (100%)
Failed		0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)	2 (100%)
Negative		0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	1 (100%)
Non druggable		0 (0%)	1 (25%)	3 (75%)	4 (100%)
Totale		2 (22.2%)	3 (33.3%)	4 (44.4%)	9 (100%)

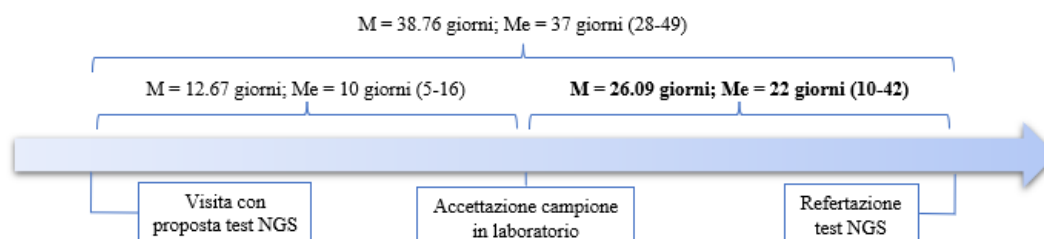
### **b. Iter diagnostico NGS metacroni**

Tutti i 33 pazienti che hanno eseguito un secondo test NGS in metacrono rispetto al primo erano in progressione di malattia dopo una mediana di due linee terapeutiche fallite (Q1=1; Q3=3). Il 57.58% (n=19) dei pazienti vi ha avuto accesso tramite l'ordinaria pratica clinica e il restante 42.42% (n=14) tramite i protocolli di studio RATIONAL (n=9) e ROME (n=5). Ventidue test (66.67%) sono stati eseguiti su biopsia liquida, utilizzando i pannelli NGS Avenio® ctDNA Expanded Panel (n=17) e FoundationOne® Liquid CDx, (n=5) e mentre negli altri undici test (33.33%) si è analizzato il campione solido con i kit FoundationOne®CDx (F1CDx) (n=9) e Myriapod® NGS Cancer Panel DNA (NG 033 panel) (n=2).

Anche per questo secondo test le tempistiche sono state misurate in giorni, valutando l'attesa tra la visita oncologica in cui veniva proposto il test e l'accettazione del campione in laboratorio (media=12.67 giorni; mediana=10 giorni), l'attesa tra l'accettazione e l'uscita del referto (media=26.09 giorni;



mediana=22 giorni) e quindi l’attesa tra la visita e l’arrivo del referto (media=38.76 giorni; mediana=37 giorni) (vedi **Figura 11**).



*Figura 11. Tempistiche per l’elaborazione clinica e di laboratorio dei secondi test NGS metacroni; M=media; Me=mediana; Q1 e Q3 riportati tra parentesi.*

È stato quindi utilizzato il test statistico *log-rank* per confrontare le singole tempistiche in base al tipo di campione analizzato e al tipo di accesso.

Distinguendo i tempi in base al tipo di campione si ottiene un’attesa mediana tra la visita oncologica e l’accettazione in laboratorio statisticamente differente per i campioni liquidi (5.5 giorni, 95%CI 4-13 giorni) e per quelli solidi (14 giorni, 95%CI 13-nc giorni;  $p=0.005$ ). I tempi di attesa tra l’accettazione del campione e l’uscita del referto sono statisticamente differenti, rispettivamente di 38.5 giorni (95%CI 33-44 giorni) per i campioni liquidi, mentre per i campioni tissutali di 10 giorni (95%CI 7-NC giorni;  $p<0.001$ ). Infine, la mediana di attesa tra la prima visita e l’arrivo del referto è di 41 giorni (95%CI 36-50 giorni) per i test su plasma e di 32 giorni (95%CI 21-NC giorni) per quelli su tessuto, differenza statisticamente significativa ( $p = 0.021$ ) (vedi **Tabella XII**).

**Tabella XII.** Intervallo di tempo tra visita e uscita del referto del secondo test NGS metacrono, distinto per tipo di prelievo (biopsia liquida o tissutale); NC = non calcolabile

	<b>N (pz)</b>	<b>Mediana (giorni)</b>	<b>Lower 95%CI (giorni)</b>	<b>Upper 95%CI (giorni)</b>
<b>Tutti i pazienti</b>	33	37	34	49
<b>Biopsia liquida</b>	22	41	36	50
<b>Biopsia tissutale</b>	11	32	21	NC
<b><math>p=0.021</math></b>				

Nella distinzione in base al tipo di accesso si è vista un’attesa mediana tra la visita oncologica e l’accettazione del campione in laboratorio di 5 giorni (95%CI 1-10 giorni) nella pratica clinica e di 16.5 giorni (95%CI 14-34 giorni) nei trial clinici

con  $p < 0.001$  statisticamente significativo; l'attesa tra l'accettazione e l'uscita del referto è stata rispettivamente di 41 giorni (95%CI 34-49 giorni) e di 8.5 giorni (95%CI 7-11 giorni) con  $p < 0.001$  statisticamente significativo; infine c'è stata un'attesa complessiva tra la visita oncologica e l'arrivo del referto al paziente di 46 giorni (95%CI 40-54 giorni) nell'ambito della pratica clinica e di 27.5 giorni (95%CI 21-45 giorni) nell'ambito dei protocolli di studio, con un  $p$  value pari a 0.002 (vedi **Tabella XIII**).

Venendo all'analisi multivariata, per quanto riguarda il tempo tra visita e accettazione del campione, è risultata statisticamente significativa solo la correlazione con il tipo di accesso ( $p < 0.001$ ). Per il tempo accettazione-refertazione, nessuna delle correlazioni è risultata statisticamente significativa. Per quanto riguarda, infine, l'attesa tra visita oncologica e refertazione è risultata statisticamente significativa solo la correlazione tra attesa con il tipo di accesso ( $p = 0.048$ ).

In questo secondo set di test NGS le differenze tra le due tipologie di accesso sono state statisticamente significative anche se leggermente meno marcate, con una differenza di 18.5 giorni, probabilmente a causa del basso numero di elementi analizzati, ma riconfermando il trend visto alla prima analisi, secondo cui l'analisi dei campioni con test NGS risulta più rapida nell'ambito dei trial clinici.

**Tabella XIII.** Intervallo di tempo tra prima visita e uscita del referto dei secondi test NGS metacroni, distinto per tipo di accesso (pratica clinica o protocollo di studio)

	<b>N (pz)</b>	<b>Mediana (giorni)</b>	<b>Lower 95%CI (giorni)</b>	<b>Upper 95%CI (giorni)</b>
<b>Tutti i pazienti</b>	33	37	34	49
<b>Pratica clinica</b>	19	46	40	54
<b>Protocollo di studio</b>	14	27.5	21	45
<b><math>p=0.002</math></b>				

### c. Iter terapeutico NGS metacroni

I risultati dei test NGS sono stati distinti in *druggable*, *non druggable*, *negative* e *failed*, come già enunciato nei paragrafi precedenti: 12 test (36.36%) hanno dato un risultato *druggable*, 10 test (30.30%) sono risultati *negative*, 8 test (24.24%) hanno dato un risultato *non druggable* e 3 test (9.09%) sono falliti. Dei 12 pazienti riportanti alterazioni *druggable* all'analisi NGS, 6 hanno poi ricevuto una terapia target, di cui 4 tramite i protocolli standard, uno ha ricevuto il farmaco off-label e un altro vi ha avuto accesso tramite trial clinico.

L'iter seguito è riassunto nella **Figura 12** e **13**:

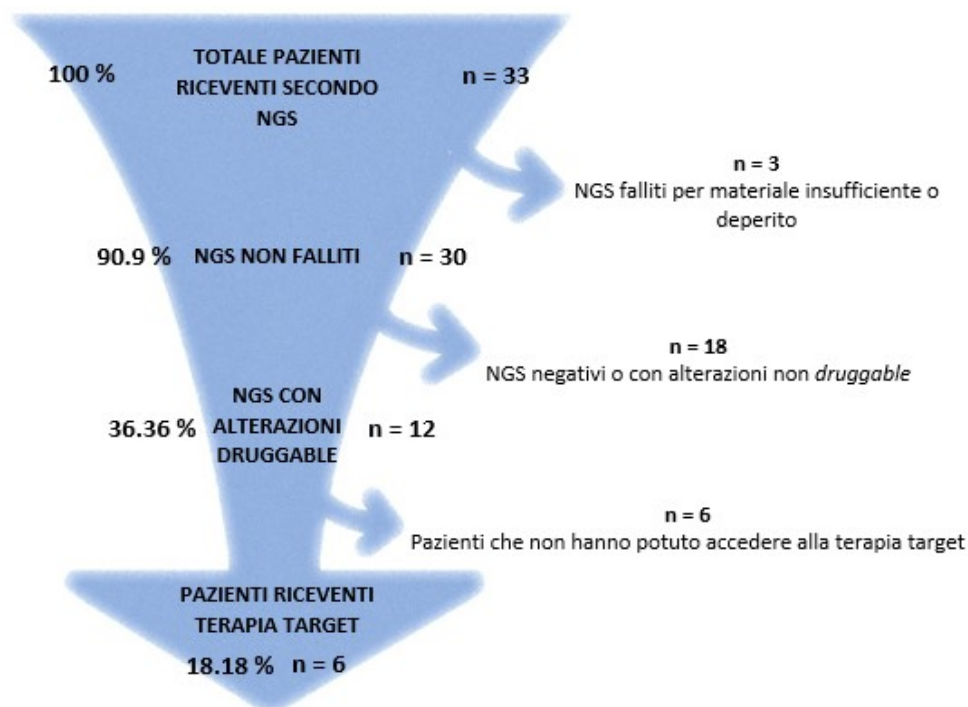


Figura 12. Il grafico mostra il percorso dei pazienti dal secondo test NGS all'inizio della terapia target: inizialmente sono stati inclusi 33 pazienti che hanno eseguito il test, sono quindi stati esclusi 21 test falliti, negativi o che non riportavano alterazioni *druggable*; infine 22 pazienti non hanno potuto accedere alla terapia target perché perso in follow-up, deceduti, già trattati con farmaci mirati o non includibili nei protocolli terapeutici.

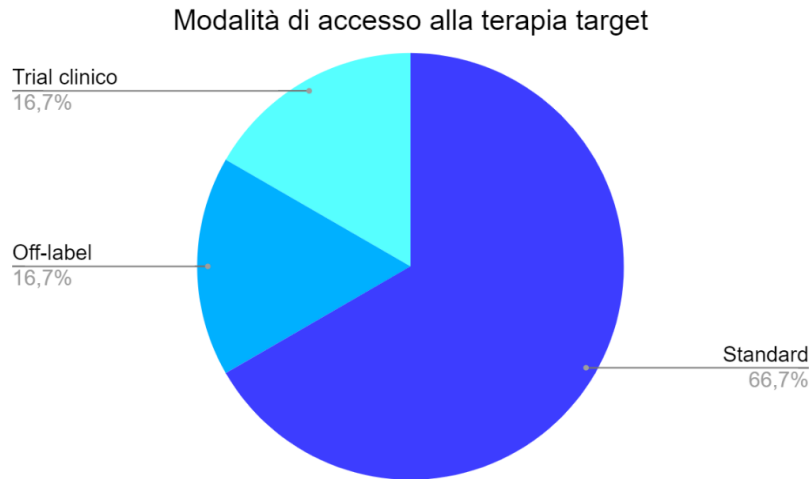


Figura 13. Modalità con cui i 6 pazienti hanno avuto accesso alla terapia target in seguito al secondo test NGS.

In quattro pazienti era già stata iniziata un'altra linea terapeutica prima dell'arrivo del referto del test NGS con una modifica del farmaco all'uscita dell'esito del test; in un paziente si è atteso il referto prima di iniziare la somministrazione e in un altro è stata iniziata un'altra terapia prima dell'uscita del risultato, per poi modificarla solo al momento della progressione della malattia.

I restanti sei pazienti non hanno potuto ricevere una terapia mirata per i seguenti motivi:

- perdita del paziente nel corso del follow-up, per cui manca l'informazione riguardante il loro protocollo terapeutico (n=2);
- scadimento delle condizioni del paziente poco dopo l'arrivo del risultato e impossibilità a iniziare la terapia (n=1);
- l'alterazione *druggable* trovata con il test NGS corrispondeva a quella trovata con i test molecolari basali, per cui era già stata fatta una target therapy, che aveva fallito con progressione della malattia (n=2);
- mutazione non comune di BRAF per cui non c'erano sufficienti evidenze scientifiche a favore della target therapy per questa variante (n=1).

Dei 153 pazienti analizzati in questo studio, 37 hanno avuto accesso a un farmaco mirato contro una specifica mutazione *driver* individuata con tecniche di analisi molecolari basali tradizionali o attraverso diversi tipi di pannelli NGS. Questi

pazienti hanno mostrato una mOS significativamente migliore (17 mesi; 95%CI 8-47.25) rispetto a coloro che non hanno mai avuto accesso a una terapia target (7.4 mesi; 95%CI 3.3-19.2;  $p < 0.001$ ) (vedi **Figura 14**).

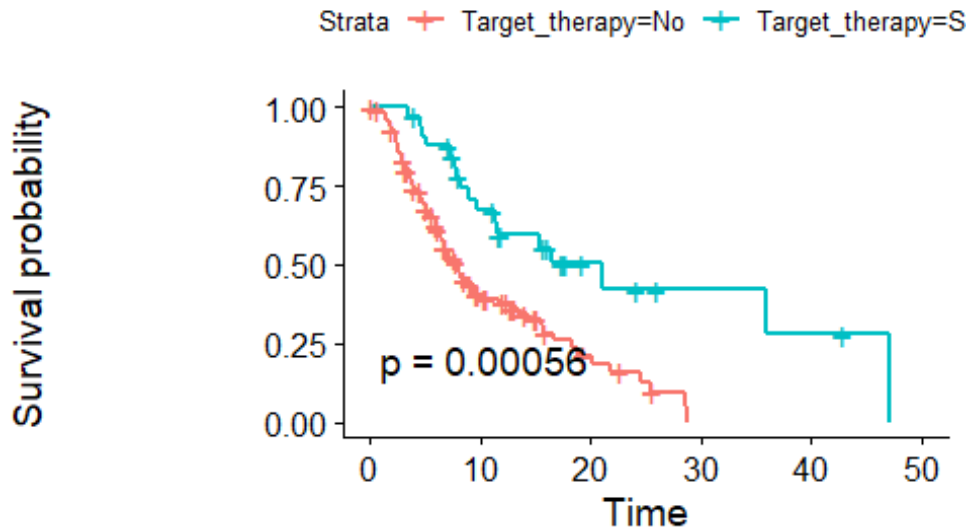


Figura 14. Curva Kaplan Meier per sopravvivenza dei 37 pazienti che hanno ricevuto una target therapy in seguito ad analisi molecolari tradizionali e/o test NGS.

I pazienti che hanno ricevuto una target therapy in seguito a un'analisi con pannello NGS erano 19 (13 dopo il primo test e 6 al secondo). Quattro di essi hanno ricevuto terapia target anche prima di effettuare il test NGS.

Per quanto riguarda i 15 pazienti che hanno ricevuto una target therapy solo successivamente al test NGS, si è vista una sopravvivenza significativamente migliore (16 mesi; 95%IC 8-36), rispetto a coloro che non hanno mai potuto accedere a un approccio mirato (7.4 mesi; 95%IC 3.3-19.2;  $p$  value pari a 0.033) (vedi **Figura 15**).

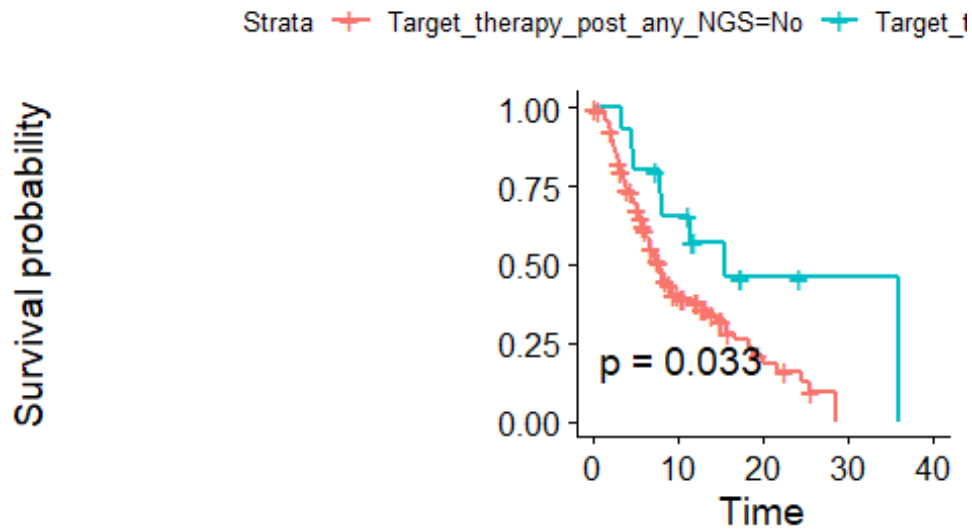


Figura 15. Curva Kaplan Meier per sopravvivenza dei 15 pazienti che hanno ricevuto una target therapy solo in seguito ad analisi con pannello NGS.

La PFS mediana dei 19 pazienti che hanno ricevuto una target therapy in seguito ad analisi con pannello NGS era 9.4 mesi (95%CI 5.3-NC) (**Figura 16**), mentre le singole PFS, con i pazienti codificati in base alla target therapy ricevuta, sono riportate in **Figura 17**.

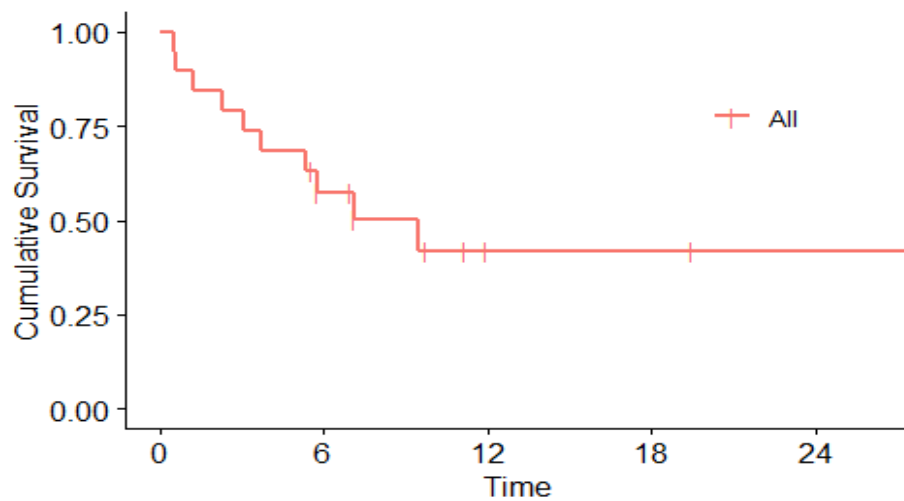


Figura 16. PFS mediana dei pazienti che hanno ricevuto una target therapy in seguito ad analisi con pannello NGS.

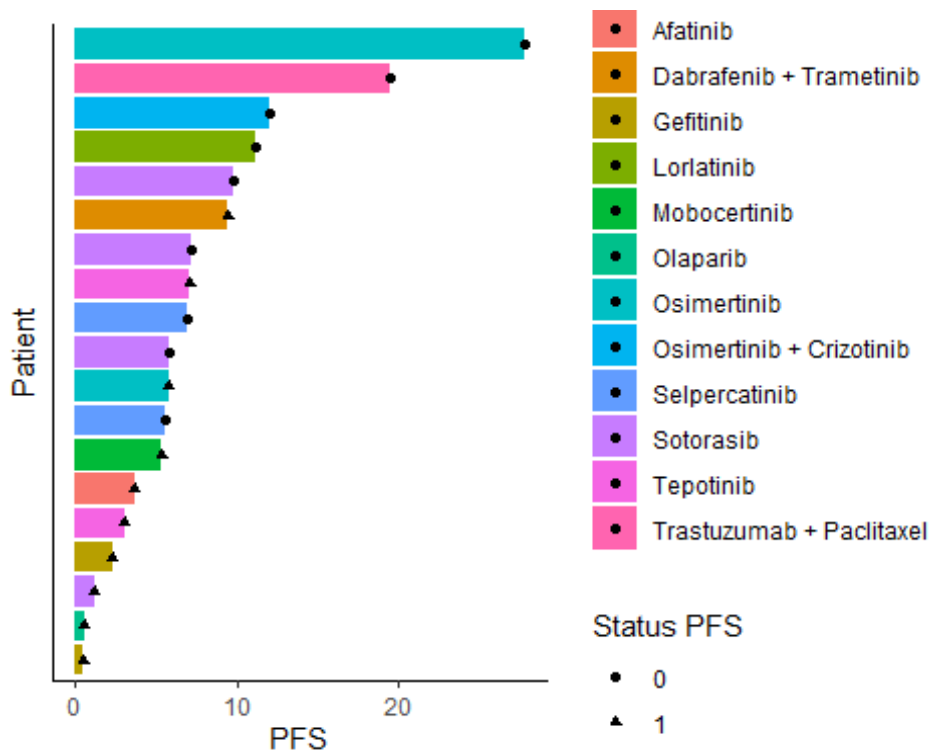


Figura 17. Singole PFS dei pazienti che hanno ricevuto una target therapy in seguito ad analisi con pannello NGS.





## DISCUSSIONE

Nell'ultimo decennio la caratterizzazione molecolare del tumore polmonare è diventata fondamentale per una corretta gestione diagnostica e terapeutica del paziente, potendo identificare mutazioni *driver* contro cui esistono numerosi farmaci mirati ed efficaci nel migliorare l'outcome del paziente. Nell'ambito della caratterizzazione molecolare del tumore non a piccole cellule, l'applicazione di tecniche di sequenziamento ad alta produttività come i pannelli NGS è ancora oggetto di studio. Nonostante ad oggi i dati sulla sua effettiva applicazione in ambito clinico siano ancora limitati, il sequenziamento di nuova generazione permette la rilevazione di multiple alterazioni genetiche, a partire da DNA o RNA, sia su campioni tissutali che su plasma. Questi pannelli consentono lo studio contemporaneo dei classici geni associati al NSCLC (*ALK*, *BRAF*, *EGFR*, *NTRK*, *ROS1*), individuando anche le mutazioni non comuni spesso non rilevate dai singoli test genetici, ma anche studiando altri geni che potrebbero riportare alterazioni significative per l'andamento della malattia. Lo scopo di questo studio retrospettivo è stato proprio quello di descriverne l'utilizzo tra dicembre 2017 e luglio 2022 su 153 pazienti affetti da NSCLC in stadio avanzato all'interno dell'ordinaria pratica clinica e di alcuni trial clinici (RATIONAL, ROME, VISION) in corso presso l'Istituto Oncologico Veneto.

La maggior parte dei pazienti ha eseguito il test NGS dopo una prima analisi con i tradizionali test genetici singoli, ma in tre pazienti alla diagnosi è stata fatta una richiesta in parallelo per le due tipologie di test: per un paziente il risultato è stato concordante tra le due analisi, mentre per gli altri due all'NGS è stata riscontrata una sostituzione che non era stata indagata con i test singoli. Nello studio di Park et al. venivano confrontati i risultati forniti dai singoli test genetici per i geni *EGFR*, *ALK* e *ROS1* con quelli ottenuti dai pannelli NGS somministrati in una popolazione di 214 pazienti affetti da tumore polmonare: secondo questo studio la concordanza tra i risultati era sempre superiore al 92% e i casi discordanti erano legati soprattutto a falsi negativi dei test singoli, probabilmente per limitazioni tecniche. In particolare, il test NGS era utile per ricontrollare soggetti *EGFR wild type* e soggetti in cui l'IHC e la FISH per l'analisi di *ALK* e *ROS1* erano discordanti. In questo studio si suggeriva quindi l'utilità dell'implementazione dei test NGS come prima

linea per la caratterizzazione molecolare dei pazienti con tumore polmonare, ma questo si scontrava con delle limitazioni organizzative ed economiche vigenti in Corea del Sud (42). In un altro studio di Wanlong et al. venivano analizzati in pazienti con diversi tipi di tumore i geni *EGFR*, *BRAF* e *KRAS* tramite test NGS su tessuto e test molecolari tradizionali con kit approvati dall'FDA. Confrontando i risultati riportati dalle due tipologie di test, si è registrata una performance superiore dei pannelli NGS nel rilevare le mutazioni di suddetti geni con un significativo miglioramento della gestione terapeutica dei pazienti. I risultati di questo studio favorivano quindi l'utilizzo in prima linea dei test NGS per il sequenziamento dei geni *EGFR*, *BRAF* e *KRAS*, in quanto metodiche sensibili e affidabili nel rilevarne tutte le possibili mutazioni, *indels* e amplificazioni con possibile significato clinico (57). Anche secondo quanto riportato da De Maglio e colleghi l'utilizzo di test NGS dovrebbe essere preferito ai singoli test, per ottimizzare al meglio il poco tessuto prelevabile dai pazienti in stadio avanzato, e rendere più efficienti tempi e costi nelle analisi molecolari. L'utilizzo di singoli test genetici potrebbe comunque rimanere una valida risorsa in presenza di campioni non adatti all'analisi con pannelli NGS. Nel nostro studio le due tipologie di test sono state usate in parallelo solo in tre casi e nei due discordanti il gene *KRAS* non era stato valutato con un test genetico singolo: il confronto dei risultati risulta quindi limitato, ma si voleva sottolineare la maggior sensibilità dei pannelli NGS rispetto ai test singoli nell'individuare alterazioni *driver* comuni e non.

Nella nostra esperienza, il test NGS è stato somministrato in 101 pazienti alla progressione della malattia già in stadio avanzato: questi pazienti venivano spesso da una lunga storia di malattia, per cui avevano già ricevuto svariate linee terapeutiche fallite e avevano probabilmente sviluppato nel tempo un maggior carico mutazionale che alimentava la malattia. In questo studio non è stato possibile ricavare un'associazione diretta tra il numero di terapie sistemiche somministrate fallite con il timing di esecuzione del test NGS, ma pensiamo che avere accesso a un'analisi molecolare approfondita tramite test NGS alla diagnosi della malattia avanzata, potrebbe portare a una migliore gestione clinica dei pazienti. Questo perché un minor carico mutazionale risulta essere più vantaggioso in termini di sopravvivenza, in quanto si è visto in diversi studi che l'OS ha un andamento inversamente proporzionale rispetto al numero di mutazioni sviluppate dalla neoplasia.

Nel confrontare la gestione dei test NGS tra pratica clinica e protocolli di studio, sia su plasma che tessuto, è emersa una significativa differenza in termini di tempo intercorso tra la prima visita oncologica, in cui veniva proposto il test NGS, e la refertazione: nella pratica clinica si aveva un'attesa mediana di 49 giorni (95%CI 41-64 giorni) contro i soli 29 giorni (95%CI 26-35 giorni) nell'ambito dei trial. Questa importante differenza è molto probabilmente legata alla differente realtà che caratterizza i trial clinici e la pratica clinica: all'interno dei protocolli di studio esistono infatti corsie disegnate *ad hoc*, che permettono una più rapida ed efficiente gestione e analisi del campione del paziente arruolato. Questo setting si discosta molto dalla realtà della pratica clinica, in quanto nei trial non si tiene conto dei quotidiani carichi di lavoro dei laboratori, che oltre a seguire i test NGS hanno anche altre importanti mansioni diagnostiche da coordinare. Inoltre, non bisogna dimenticare la grave pandemia che abbiamo affrontato negli ultimi anni, la quale potrebbe aver influito negativamente sulla produttività delle strutture ospedaliere. Andando a valutare più nel dettaglio le tempistiche tra l'accettazione del campione in laboratorio e la refertazione del test NGS si vede un'attesa mediana di 33 giorni (95%CI 31-42 giorni) nella pratica clinica e di 10 giorni (95%CI 9-11 giorni) nei protocolli di studio, risultato compatibile con quelli ottenuti dei test con kit Guardant360 eseguiti sui pazienti arruolati per lo studio VISION da Bonanno et al.

Tra i pazienti che hanno eseguito il secondo test NGS, in nove pazienti l'analisi è stata richiesta in contemporanea su campione solido e su plasma in diversi setting clinici o di studio già descritti. I risultati dei due test sono stati concordanti in cinque casi, mentre per quattro pazienti c'è stato un risultato discordante: in particolare in due pazienti il test eseguito su tessuto è fallito, mentre quello su plasma è andato a buon fine. È risaputo che spesso può essere difficile ricavare da pazienti oncologici in stadio avanzato un adeguato campione solido da sottoporre alle analisi, perché questi pazienti faticano a sopportare le manovre invasive per il prelievo e i reperti ottenuti possono comunque non essere sufficientemente rappresentativi della neoplasia. In questo frangente l'utilizzo della biopsia liquida si è rivelato una sensibile e affidabile alternativa per ottenere un'adeguata quantità di acidi nucleici per la caratterizzazione molecolare del paziente, come dimostrato dagli studi di Pavan et al. e Mack et al (55-56). Inoltre, il materiale genetico ottenuto dal sangue contiene molecole di DNA provenienti dal tumore primario, ma anche dalle metastasi, garantendo una miglior riproduzione dell'eterogeneità tumorale. Anche

nelle linee guida ESMO si raccomanda l'utilizzo dei test NGS sia su tessuto ma anche su plasma nei pazienti con NSCLC avanzato per individuare alterazioni molecolari target ESCAT I. Per quanto i nostri risultati siano limitati a pochi pazienti si potrebbe quindi pensare che per pazienti con tumore polmonare avanzato una contemporanea analisi NGS sia su tessuto che su plasma potrebbe essere utile per essere sicuri d'individuare eventuali alterazioni target candidabili a terapia mirata.

In seguito alle prime analisi con test NGS, 26 test sono falliti per inadeguatezza del campione analizzato: di questi 24 erano stati eseguiti su biopsia solida e 2 su biopsia liquida. Questo dato rimarca il fatto che spesso i campioni tissutali possono non essere qualitativamente o quantitativamente idonei per svolgere le analisi molecolari necessarie alla caratterizzazione del paziente, mentre nelle biopsie liquide non si riscontra suddetto problema. Andando a vedere anche tra i test sincroni due test su tessuto erano falliti, mentre i rispettivi su biopsia liquida erano andati a buon fine. Il nostro risultato è concorde con quanto riscontrato da Bonanno et al. in cui su 104 NGS eseguiti su tessuto, il 50% erano falliti per materiale inadeguato, mentre nessuno dei 209 test eseguiti su plasma è fallito. Tra i pazienti analizzati nel nostro studio che avevano eseguito anche un secondo NGS, tre hanno riportato un esito *failed*, tutti a seguito di un'analisi su tessuto.

Nel pool di pazienti che hanno eseguito un primo NGS, coloro i quali hanno riportato una qualsiasi alterazioni molecolare erano 111 (72.55%), mentre a seguito del secondo NGS varie mutazioni somatiche sono state ritrovate in 20 pazienti su 42. Questi valori risultano essere minori rispetto a quelli di Mack et al., in cui la percentuale di pazienti con NSCC riportanti alterazioni somatiche arrivava all'86%: questo forse dovuto alla differenza tra il loro campione (n=8388) e il nostro (n=153). Tra le varie mutazioni quelle classificate come *druggable* sono state il 22.88% (n=35) al primo NGS e il 33.33% (n=14) al secondo NGS. Di questi pazienti riportanti alterazioni *druggable*, 13 (37.14%) hanno ricevuto una terapia target dopo il primo NGS e 6 dopo il secondo, attraverso protocolli standard, trial clinici o per via *off-label*. I risultati ottenuti sono simili a quanto riportato in letteratura per cui sia all'interno di trials che nell'ambito della pratica clinica (54) si è riscontrata la presenza di mutazioni *druggable* nel 40% dei casi, con successivo accesso alle terapie target nel 15% di questi. Ciò che è importante sottolineare a

seguito dei nostri risultati è che l'utilizzo dei pannelli NGS ha permesso l'identificazione di alterazioni target non rilevate ai precedenti test molecolari, indirizzando così i pazienti verso protocolli terapeutici già validati dagli enti regolatori internazionali; per di più, ha permesso inserimento di altri pazienti all'interno di iter terapeutici ad accesso programmato e trial clinici e ha anche consentito l'accesso a farmaci off-label attivi contro la mutazioni riportata, ma non ancora approvati per l'uso sul tumore polmonare. In questo frangente bisogna anche però considerare che l'aver avuto accesso al farmaco nell'ambito di un trial o per via *off-label*, ha altresì contribuito ad allungare ulteriormente le tempistiche con cui i pazienti hanno potuto accedere a una terapia efficace per il loro status molecolare, con un possibile impatto sul loro outcome clinico. Inoltre, in tre pazienti riportanti alterazioni *druggable*, a causa del veloce scadimento delle condizioni cliniche generali fino al decesso, non è stato possibile intervenire con alcuna terapia target: questo suggerisce come sia fondamentale arrivare a un'adeguata caratterizzazione molecolare quanto prima possibile, in modo da poter iniziare un'eventuale terapia che potrebbe comportare un significativo miglioramento nell'outcome del paziente.

Infine, a seguito sia dei test molecolari basali sia dei test NGS, 37 dei pazienti analizzati in questo studio hanno ricevuto un farmaco mirato contro una specifica mutazione *druggable* con un miglioramento statisticamente significativo della sopravvivenza globale rispetto a coloro i quali non avevano ricevuto alcuna terapia target. Di questi i pazienti che hanno ricevuto un trattamento mirato in seguito a un'analisi NGS erano 19 e anche per questi l'*overall survival* è stata significativamente migliore rispetto a quella dei pazienti che non hanno ricevuto alcuna target therapy (**Figure 14 e 15**).



## CONCLUSIONI

Nella moderna era della medicina di precisione le tecniche di sequenziamento di nuova generazione (NGS) rappresentano un importante strumento per la caratterizzazione molecolare del tumore polmonare non a piccole cellule. Nel presente studio retrospettivo abbiamo descritto l'utilizzo di diverse tipologie di pannelli NSG all'interno dell'Istituto Oncologico Veneto, nella pratica clinica e all'interno di trial clinici. Rispetto ai tradizionali metodi di analisi singoli, i pannelli NGS permettono la valutazione contemporanea di più geni nelle loro varianti più comuni e più rare, individuando alterazioni che altrimenti non verrebbero indagate. L'esecuzione di questo test alla diagnosi della malattia, piuttosto che in progressione o dopo numerose linee terapeutiche fallite, potrebbe essere più vantaggioso per il paziente, visto che le sue condizioni cliniche generali potrebbero essere migliori, permettendo il tempestivo arrivo del referto e l'inizio di un'eventuale terapia target. Inoltre, potrebbe essere utile l'esecuzione (anche contemporanea) dell'analisi NGS oltre che su campione solido, parimenti su biopsia liquida, soprattutto per quei pazienti che non presentano masse facili da raggiungere o che non possono sopportare manovre invasive per il prelievo. Le tempistiche con cui vengono svolte le analisi nella pratica clinica potrebbero essere ulteriormente migliorate, magari implementando delle modifiche nella gestione in laboratorio del campione. Per questo aspetto potrebbe essere utile uno studio mirato a capire quali sono le odierne necessità nei laboratori oncologici, eventualmente con uno specifico sguardo rivolto alla nostra realtà patavina. Infatti, l'implementazione delle metodiche NGS presso le nostre strutture di anatomia patologica risulta essere recente, per cui si stanno ottimizzando gli algoritmi diagnostici, in merito al tipo di test da scegliere (analisi sequenziale o NGS) anche in base al campione disponibile (reperto chirurgico, piuttosto che piccola biopsia o plasma). Infine, si rimarca l'efficacia delle terapie target nel migliorare la sopravvivenza dei nostri pazienti, per cui dovrebbe essere sicuramente incoraggiato l'utilizzo di avanzate tecniche di sequenziamento, come l'NGS, per un'adeguata caratterizzazione molecolare della malattia oncologica.





## BIBLIOGRAFIA

1. I Numeri del Cancro 2021; AIOM, AIRTUM
2. Linee Guida Neoplasie del Polmone 2021; AIOM
3. Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up 2020; ESMO Guidelines Committee
4. Julie A, Barta, Charles A. Powell and Juan P. Wisnivesky; Global Epidemiology of Lung Cancer; Global Health; Art.8; 1-16; 2019
5. Istituto Superiore di Sanità. Abitudine al fumo. la ricerca in occasione della Giornata mondiale senza tabacco 2021. Available from: <https://www.bva-doxa.com/abitudine-al-fumo-la-ricerca-in-occasione-della-giornata-mondiale-senza-tabacco-2021/>
6. Rugarli C., Cappelli G., Cappellini M. D., Cavallo Perin P., Corazza G. R., Carxi A., Crea F., Fabbri L., Ferraccioli G., Giustina A., Lazzarin A., Nuti R., Sabbadini M.G., Stella A. P.; Rugarli, Medicina Interna Sistemica; Vol.1; VII edizione; Edizioni Edra; 1003-1013; 2015
7. Patricia M. de Groot, Carol C. Wu, Brett W. Carter, Reginald F. Munden; The epidemiology of lung cancer; Trans Lung Cancer Res; Vol.7, No 3; 220-233; 2018
8. Raphael Rubin, David S. Strayer, Emanuel Rubin; Anatomia patologica: patologia d'organo e molecolare; Tomo 2; VI edizione; Piccin; 622-630; 2014
9. Stephan Altmayer, Nupur Verma, Martina Zaguini Francisco, Renata Fragomeni Almeida, Tan-Lucien Mohammed, Bruno Hochegger; Classification and imaging findings of lung neoplasms; Seminars in Roentgenology; 41-50; 2019

10. Nicholson A.G., Tsao M.S., Beasley M.B., Borczuk A.C., Brambilla E., Cooper W.A., Dacic S., Jain D., Kerr K.M., Lantuejoul S., Noguchi M., Papotti M., Rekhtman N., Scagliotti G., van Schil P., Sholl L., Yatabe Y., Yoshida A., Travis W.D.; The 2021 WHO Classification of Lung Tumors: Impact of Advances Since 2015; *J Thorac Oncol.*; Vol.17, No 3; 362-387; 2021
11. Shalles K.T., Dhirendra P.S., Jaytrillok C.; Lung cancer identification: a review on detection and classification; *Cancer Metastasis Rev*; Vol.39; 989-998; 2020
12. Reem Nooreldeen, Horacio Bach; Current and future development in lung cancer diagnosis; *International Journal of Molecular Sciences*; Vol.22; 1-18; 2021
13. Oudkerk M, Devaraj A, Vliegenthart R, Henzler T, Prosch H, Heussel CP, Bastarrika G, Sverzellati N, Mascalchi M, Delorme S, Baldwin DR, Callister ME, Becker N, Heuvelmans MA, Rzyman W, Infante MV, Pastorino U, Pedersen JH, Paci E, Duffy SW, de Koning H, Field JK.; European position statement on lung cancer screening; *Lancet Oncol*; Vol.18; 754-766; 2017
14. de Koning HJ, van der Aalst CM, de Jong PA, Scholten ET, Nackaerts K, Heuvelmans MA, Lammers JJ, Weenink C, Yousaf-Khan U, Horeweg N, van 't Westeinde S, Prokop M, Mali WP, Mohamed Hoesein FAA, van Ooijen PMA, Aerts JGJV, den Bakker MA, Thunnissen E, Verschakelen J, Vliegenthart R, Walter JE, Ten Haaf K, Groen HJM, Oudkerk M.; Reduced Lung-Cancer Mortality with Volume CT Screening in a Randomized Trial; *N Engl J Med*; Vol.6; 503-513; 2020
15. Alesha A. Thai, Benjamin Solomon, Lecia V. Sequist, Justin F. Gainor, Rebecca S. Heist; Lung cancer; *Lancers*; Vol.398; 535-554; 2021
16. Alessandro Marra; Modern management of Pancoast Tumor; *Zentralbl Chir*; Vol.143 No3; 316-330; 2018

17. Timothy J Martin; Horner syndrome: a clinical review; ACS Chemical Neuroscience; Vol.9; 177-186; 2018
18. Lynn D. Wilson, Frank C. Detterbeck, Joachim Yahalom; Superior vena cava syndrome with malignant causes; N Engl J Med; Vol.356; 1862-1869; 2007
19. Yap FY, Skalski MR, Patel DB, Schein AJ, White EA, Tomasian A, Masih S, Matcuk GR Jr; Hypertrophic Osteoarthropathy: Clinical and Imaging Features; Radiographics; Vol.37 No 1; 157-195; 2017
20. Lauren G. Collins, Christopher Heines, Robert Perkel, Robert E. Enck; Lung cancer: diagnosis and management; American Family Physician; Vol.75 No1; 56-63; 2007
21. D. Groheux, G. Quere, E. Blanc, C. Lemarignier, L. Vercellino, C. de Margerie-Mellon, P. Merlet, S. Querellou; FDG PET TC for solitary pulmonary nodule and lung cancer: literature review; Diagnostic and Interventional Imaging; Vol.97; 1003-1017; 2016
22. Mohsen Farsad; FDG PET CT in staging of lung cancer; Current Radiopharmaceuticals; Vol.13; 195-203; 2020
23. Frank C. Detterbeck; The eight edition TNM stage classification for lung cancer: what does it mean on main street?; Thoracic: Feature Expert Opinion: Lung Cancer; Vol.155 No1; 356-359; 2017
24. Tim Akhurst; Staging of NSCLC; PET Clin; Vol.13 No1; 1-10; 2018
25. Normanno N, De Luca A, Bianco C, Strizzi L, Mancino M, Maiello MR, Carotenuto A, De Feo G, Caponigro F, Salomon DS; Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer; Gene; Vol. 366 No1; 2-16; 2006
26. Luo J, Shen L, Zheng D; Diagnostic value of circulating free DNA for the detection of EGFR mutation status in NSCLC: a systematic review and meta-analysis; Sci Rep; Vol.4 No 6269; 1-7; 2014

27. Qiu M, Wang J, Xu Y, Ding X, Li M, Jiang F, Xu L, Yin R; Circulating tumor DNA is effective for the detection of EGFR mutation in non-small cell lung cancer: a meta-analysis; *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*; Vol.24 No1; 206-212; 2015
28. Leonetti A, Facchinetti F, Rossi G, Minari R, Conti A, Friboulet L, Tiseo M, Planchard D; BRAF in non-small cell lung cancer (NSCLC): Pickaxing another brick in the wall; *Cancer Treat Rev*; Vol.66; 82-94; 2018
29. Shaw AT, Engelman JA. ALK in lung cancer: past, present, and future; *J Clin Oncol*; Vol.31 No8; 1105-1111; 2013
30. Niu X, Chuang JC, Berry GJ, Wakelee HA; Anaplastic Lymphoma Kinase Testing: IHC vs. FISH vs. NGS; *Curr Treat Options Oncol*; Vol.18 No12; 71; 2017
31. Lin JJ, Shaw AT; Recent Advances in Targeting ROS1 in Lung Cancer; *J Thorac Oncol*; Vol.12 No11; 1611-1625; 2017
32. Harada G, Santini FC, Wilhelm C, Drilon A; NTRK fusions in lung cancer: From biology to therapy; *Lung Cancer*; Vol.161; 108-113; 2021
33. Amita Sharma, Jo-Anne O Shepard; Lung cancer biopsies; *Radiol Clin North Am*; Vol.56 No3; 377-390; 2018
34. Raccomandazioni 2020 per l'esecuzione di Test Molecolari su Biopsia Liquida in Oncologia; AIOM, SIAPEC-IAP, SIBIOC, SIF
35. Pisapia P, Costa JL, Pepe F, Russo G, Gragnano G, Russo A, Iaccarino A, de Miguel-Perez D, Serrano MJ, Denninghoff V, Quagliata L, Rolfo C, Malapelle U; Next generation sequencing for liquid biopsy based testing in non-small cell lung cancer in 2021; *Crit Rev Oncol Hematol*; Vol.161; 1-10; 2021

36. Katarzyna Wadowska, Iwona Bil-Lula, Lukasz Trembecki, Mariola Sliwinska-Mosson; Title: Genetic markers in lung cancer diagnosis: a review; International Journal of Molecular Sciences; Vol.21; 1-22; 2020
37. Alix-Panabières C, Pantel K; Liquid Biopsy: From Discovery to Clinical Application; Cancer Discov; Vol.11 No4; 858-873; 2021
38. Ignatiadis M, Sledge GW, Jeffrey SS; Liquid biopsy enters the clinic - implementation issues and future challenges; Nat Rev Clin Oncol; Vol. 18 No5; 297-312; 2021
39. Cescon DW, Bratman SV, Chan SM, Siu LL; Circulating tumor DNA and liquid biopsy in oncology; Nat Cancer; Vol.1 No3; 276-290; 2020
40. Russo A, Incorvaia L, Del Re M, Malapelle U, Capoluongo E, Gristina V, Castiglia M, Danesi R, Fassan M, Giuffrè G, Gori S, Marchetti A, Normanno N, Pinto C, Rossi G, Santini D, Sartore-Bianchi A, Silvestris N, Tagliaferri P, Troncone G, Cinieri S, Beretta GD; The molecular profiling of solid tumors by liquid biopsy: a position paper of the AIOM-SIAPEC-IAP-SIBioC-SIC-SIF Italian Scientific Societies; ESMO Open; Vol.6 No3; 2021
41. Tsoulos N, Papadopoulou E, Metaxa-Mariatou V, Tsaousis G, Efstathiadou C, Tounta G, Scapeti A, Bourkoula E, Zarogoulidis P, Pentheroudakis G, Kakolyris S, Boukovinas I, Papakotoulas P, Athanasiadis E, Floros T, Koumarianou A, Barbounis V, Dinischiotu A, Nasioulas G; Tumor molecular profiling of NSCLC patients using next generation sequencing; Oncol Rep; Vol. 38 No6; 3419-3429; 2017
42. Park E, Shim HS; Detection of Targetable Genetic Alterations in Korean Lung Cancer Patients: A Comparison Study of Single-Gene Assays and Targeted Next-Generation Sequencing; Cancer Res Treat; Vol.52 No2; 546-551; 2020

43. Pennell NA, Arcila ME, Gandara DR, West H; Biomarker Testing for Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: Real-World Issues and Tough Choices; Am Soc Clin Oncol Educ Book; Vol.39; 531-542; 2019
44. Paz-Ares L, Ciuleanu TE, Cobo M, Schenker M, Zurawski B, Menezes J, Richardet E, Bennouna J, Felip E, Juan-Vidal O, Alexandru A, Sakai H, Lingua A, Salman P, Souquet PJ, De Marchi P, Martin C, Pérol M, Scherpereel A, Lu S, John T, Carbone DP, Meadows-Shropshire S, Agrawal S, Oukessou A, Yan J, Reck M; First-line nivolumab plus ipilimumab combined with two cycles of chemotherapy in patients with non-small-cell lung cancer (CheckMate 9LA): an international, randomised, open-label, phase 3 trial; Lancet Oncol; Vol.22 No2; 198-211; 2021
45. Luchini C, Lawlor RT, Milella M, Scarpa A; Molecular Tumor Boards in Clinical Practice; Trends Cancer; Vol.6 No9; 738-744; 2020
46. Kara L. Larson, Bin Huang, Heidi L. Weiss, Pam Hull, Philip M. Westgate, Rachel W. Miller, Susanne M. Arnold, Jill M. Kolesar; Clinical outcomes of molecular tumor boards: a systematic review; JCO Precision Oncology; 1122-1132; 2021
47. Bart Koopman, Anthonie J. van der Wekken, Arja ter Elst, T. Jeroen N. Hiltermann, Juliana F. Vilacha, Matthew R. Groves, Anke van den Berg, Birgitta I. Hiddinga, Lucie B. M. Hijmering-Kappelle, Jos A. Stigt, Wim Timens, Harry J. M. Groen, Ed Schuurin, and Léon C. van Kempen; Relevance and effectiveness of MTB recommendations for patients with non-small cell lung cancer with rare or complex mutational profiles; JCO Precision Oncology; Vol.4; 393-410; 2020
48. Antonia SJ, Villegas A, Daniel D, Vicente D, Murakami S, Hui R, Yokoi T, Chiappori A, Lee KH, de Wit M, Cho BC, Bourhaba M, Quantin X, Tokito T,

- Mekhail T, Planchard D, Kim YC, Karapetis CS, Hirt S, Ostoros G, Kubota K, Gray JE, Paz-Ares L, de Castro Carpeño J, Wadsworth C, Melillo G, Jiang H, Huang Y, Dennis PA, Özgüroğlu M; PACIFIC Investigators; Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III Non-Small-Cell Lung Cancer; *N Engl J Med*; Vol.377 No20; 1919-1929; 2017
49. Wu YL, Tsuboi M, He J, John T, Grohe C, Majem M, Goldman JW, Laktionov K, Kim SW, Kato T, Vu HV, Lu S, Lee KY, Akewanlop C, Yu CJ, de Marinis F, Bonanno L, Domine M, Shepherd FA, Zeng L, Hodge R, Atasoy A, Rukazenzov Y, Herbst RS; ADAURA Investigators; Osimertinib in Resected *EGFR*-Mutated Non-Small-Cell Lung Cancer; *N Engl J Med*; Vol.383 No18; 1711-1723; 2020
50. Hu L, Ru K, Zhang L, Huang Y, Zhu X, Liu H, Zetterberg A, Cheng T, Miao W; Fluorescence in situ hybridization (FISH): an increasingly demanded tool for biomarker research and personalized medicine; *Biomark Res*; Vol.2 No1; 1-13; 2014
51. Inamura K; Update on Immunohistochemistry for the Diagnosis of Lung Cancer; *Cancers (Basel)*; Vol.10 No72; 1-15; 2018
52. Remon J, Pignataro D, Novello S, Passiglia F; Current treatment and future challenges in ROS1- and ALK-rearranged advanced non-small cell lung cancer; *Cancer Treat Rev*; Vol.95; 2021
53. Mosele F, Remon J, Mateo J, Westphalen CB, Barlesi F, Lolkema MP, Normanno N, Scarpa A, Robson M, Meric-Bernstam F, Wagle N, Stenzinger A, Bonastre J, Bayle A, Michiels S, Bièche I, Rouleau E, Jezdic S, Douillard JY, Reis-Filho JS, Dienstmann R, André F; Recommendations for the use of next-generation sequencing (NGS) for patients with metastatic cancers: a report

- from the ESMO Precision Medicine Working Group; *Ann Oncol*; Vol.31 No11; 1491-1505; 2020
54. Bonanno L, Pavan A, Ferro A, Calvetti L, Frega S, Pasello G, Aprile G, Guarneri V, Conte P; Rete Oncologica Veneta (ROV); Clinical Impact of Plasma and Tissue Next-Generation Sequencing in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: A Real-World Experience; *Oncologist*; Vol.25 No12; 1996-2005; 2020
55. Pavan A, Bragadin AB, Calvetti L, Ferro A, Zulato E, Attili I, Nardo G, Dal Maso A, Frega S, Menin AG, Fassan M, Calabrese F, Pasello G, Guarneri V, Aprile G, Conte P, Rosell R, Indraccolo S, Bonanno L; Role of next generation sequencing-based liquid biopsy in advanced non-small cell lung cancer patients treated with immune checkpoint inhibitors: impact of STK11, KRAS and TP53 mutations and co-mutations on outcome; *Transl Lung Cancer Res*; Vol.10 No1; 202-220; 2021
56. Mack PC, Banks KC, Espenschied CR, Burich RA, Zill OA, Lee CE, Riess JW, Mortimer SA, Talasaz A, Lanman RB, Gandara DR; Spectrum of driver mutations and clinical impact of circulating tumor DNA analysis in non-small cell lung cancer: Analysis of over 8000 cases; *Cancer*; Vol.126 No14; 3219-3228; 2020
57. Ma W, Brodie S, Agersborg S, Funari VA, Albitar M. Significant Improvement in Detecting BRAF, KRAS, and EGFR Mutations Using Next-Generation Sequencing as Compared with FDA-Cleared Kits; *Mol Diagn Ther*; Vol.21 No5; 571-579; 2017
58. Dutkowska, A. E. & Antczak, A. Comorbidities in lung cancer. *Adv. Respir. Med.* 84, 186–192 (2016)



59. C. Swanton, W. Hill, E. Lim, C. Lee, C.E. Weeden, M. Augustine, K. Chen, F. Kuan, F. Marongiu, F. Rodrigues, H. Cha, T. Jacks M. Luchtenborg, I. Malanchi, J. Downward, C. Carlsten, A. Hackshaw, K.R. Litchfield, J. DeGregori, M. Jamal-Hanjani; LBA1 - Mechanism of action and an actionable inflammatory axis for air pollution induced non-small cell lung cancer: Towards molecular cancer prevention; *Annals of Oncology*; Vol.33; 808-869; 2022