

INFORMATIVA Onconext Precision Tissue

Il continuo avanzare delle conoscenze scientifiche ha permesso di sviluppare test genetici finalizzati a fornire indicazioni terapeutiche personalizzate analizzando il tessuto tumorale. L'insorgenza dei tumori è associata a diversi fattori, tra cui quelli ambientali e predisposizione genetica. Solo una piccola parte di tumori è di origine eredo familiare in cui variazioni in determinati geni aumentano il rischio di sviluppare la malattia. La maggior parte dei tumori è definita sporadica ovvero causata da alterazioni che insorgono direttamente nel tessuto colpito. Essendo quindi il cancro una patologia genetica causata dall'accumulo di alterazioni in alcuni geni specifici, analizzare questi geni e altri meccanismi molecolari alla base dell'insorgenza dei tumori può supportare l'oncologo nel proporre terapie mirate.

Finalità e vantaggi del test Onconext® Precision Tissue

Il pannello **Onconext® Precision Tissue** permette, con un singolo test, di tracciare il profilo genomico del tumore basato sull'analisi di DNA e RNA di più di 500 geni indicati in tabella 1. Vengono rilevate variazioni di singoli nucleotidi (**SNV**), variazioni del numero di copie (**CNV**), 49 geni di fusione e 46 geni coinvolti nel pathway di homologous recombination repair (**HRR**). Vengono inoltre analizzati il Tumor Mutational Burden - **TMB** (il carico mutazionale del tumore, un biomarcatore che risulta essere associato alla risposta all'immunoterapia) e i marcatori per l'instabilità dei microsatelliti - **MSI** (le differenze nel numero di ripetizioni di brevi sequenze di DNA ripetute tra il tessuto tumorale e il tessuto sano).

Tab.1. Geni inclusi nel pannello Onconext® Precision Tissue

Hotspot genes		CNV Gain genes	CNV gain and Hotspot Genes			Gene Fusions (Inter/Intra-genic)		CNV genes with CDS					CDS Only Genes	TMB only genes		
ACVR1	RGS7	ABC81	ABL1	H3-3A (H3F3A)	RAF1	AKT1	RSPO2	ABRAXAS1	CHEK2*	GATA3	NOTCH2	RNF43	CALR	A1CF	OR2L2	TPTE
ATP1A1	RHOA	CTNND2	ABL2	H3-3B (H3F3B)	RARA	AKT2	RSPO3	ACVR1B	CIC	GNA13	NOTCH3	RPA1	CIITA	ACSM2B	OR2L8	TRHDE
BCR	RPL10	DDR1	AKT1	IDH2	RET	AKT3	STAT6	ACVR2A	CREBBP	GPS2	NOTCH4	RUNX1	CYP2D6	ADAM18	OR2M3	TRIM48
BMP5	SIX1	EMSY	AKT2	IKBKB	RHEB	ALK	TERT	ADAMTS12	CSMD3	HDAC2	PALB2*	SDHA	ERCC5	ANO4	OR2T3	TRIM51
BTK	SIX2	FGF19	AKT3	IL7R	RICTOR	AR	TFE3	ADAMTS2	CTCF	HDAC9	PARP1	SDHB	FAS	ARMC4	OR2T33	ZIM3
CACNA1D	SNCAIP	FGF23	ALK	KDR	RIT1	BRAF	TFEB	AMER1	CTLA4	HLA-A	PARP2	SDHD	ID3	AURKB	OR2T4	ZNF479
CD79B	SOS1	FGF3	AR	KIT	ROS1	BRCA1	YAP1	APC	CUL3	HLA-B	PARP3	SETD2	KLHL13	BRINP3	OR2W3	ZNF536
CSF1R	SOX2	FGF4	ARAF	KLF5	SETBP1	CDKN2A		ARHGAP35	CUL4A	HNFA1	PARP4	SLX4	MTUS2	C6	OR4A15	
CTNNB1	SRSF2	FGF9	AURKA	KRAS	SF3B1	EGFR		ARID1A	CUL4B	INPP4B	PBRM1	SMAD2	PSMB10	C8A	OR4C15	
CUL1	STAT5B	FYN	AURKC	MAGOH	SLCO1B3	ERBB2		ARID1B	CYLD	JAK1	PDCD1	SMAD4	PSMB8	C8B	OR4C6	
CYSLTR2	TAF1	GLI3	AXL	MAP2K1	SMC1A	ERBB4		ARID2	CYP2C9	JAK2	PDCD1LG2	SMARCA4	PSMB9	CANX	OR4M1	
DGCR8	TGFBR1	IGF1R	BCL2	MAPK1	SMO	ERG		ARID5B	DAXX	JAK3	PDIA3	SMARCB1	RNA5H2C	CASR	OR4M2	
DROSHA	TRRAP	MCL1	BCL2L12	MAX	SPOP	ESR1		ASXL1	DDX3X	KDM5C	PGD	SOX9	RPL22	CD163	OR5D18	
E2F1	TSHR	MDM2	BCL6	MDM4	SRC	ETV1		ASXL2	DICER1	KDM6A	PHF6	SPEN	RPL5	CNTN6	OR5F1	
EPAS1	WAS	MYCL	BRAF	MECOM	STAT3	ETV4		ATM*	DNMT3A	KEAP1	PIK3R1	STAG2	RUNX1T1	CNTNAP4	OR5L1	
FGF7		RPS6KB1	CARD11	MEF2B	STAT6	ETV5		ATR	DOCK3	KMT2A	PMS1	STK11	SDHC	CNTNAP5	OR5L2	
FOXL2		RPTOR	CBL	MET	TERT	FGFR1		ATRX	DPYD	KMT2B	PMS2	SUFU	SOCS1	COL11A1	OR6F1	
FOXO1		YAP1	CCND1	MITF	TOP1	FGFR2		AXIN1	DSC1	KMT2C	POLD1*	TAP1	STAT1	DCAF4L2	OR8H2	
GLI1		YES1	CCND2	MPL	TPMT	FGFR3		AXIN2	DSC3	KMT2D	POLE*	TAP2	TMEM132D	DCDC1	OR8I2	
GNA11			CCND3	MTOR	U2AF1	MAP3K8		B2M	ELF3	LARP4B	POT1	TBK3	UGT1A1	GALNT17	OR8U1	
GNAQ			CCNE1	MYC	USP8	MET		BAP1	ENO1	LATS1	PPM1D	TCF7L2	ZBTB20	GPR158	ORC4	
H2BC5 (HIST1H2BD)			CDK4	MYCN	XPO1	MTAP		BARD1*	EP300	LATS2	PPP2R2A*	TET2		GRID2	PAK5	
H3C2 (HIST1H3B)			CDK6	MYD88	ZNF217	MYB		BCOR	EPCAM	MAP2K4	PRDM1	TGFBR2		H1-4	PCDH17	
HIF1A			CHD4	NFE2L2	ZNF429	MYBL1		BLM*	EPHA2	MAP2K7	PRDM9	TNFAIP3		(HIST1H1E)	PDE1A	
HRAS			DDR2	NRAS		NOTCH1		BMPR2	ERAP1	MAP3K1	PRKAR1A	TNFRSF14		HCN1	PDE1C	
IDH1			EGFR	NTRK1		NOTCH2		BRCA1*	ERAP2	MAP3K4	PTCH1	TP53*		HLA-C	PLXDC2	
IL6ST			EIF1AX	NTRK3		NOTCH3		BRCA2*	ERCC2	MAPK8	PTEN*	TP63		KCND2	POM121L12	
IRF4			ERBB2	PCBP1		NRG1		BRIP1*	ERCC4	MEN1	PTPRT	TPP2		KCNH7	PPFIA2	
IRS4			ERBB3	PDGFRA		NTRK1		CASP8	ERF1	MGA	RAD50	TSC1		KCNJ5	RBP3	
KLF4			ERBB4	PDGFRB		NTRK2		CBFB	ETV6	MLH1	RAD51	TSC2		KEL	REG1A	
KNSTRN			ESR1	PIK3C2B		NTRK3		CD274	FANCA	MLH3	RAD51B*	USP9X		KIR3D1L	REG1B	
MAP2K2			EZH2	PIK3CA		NUMT1		CD276	FANCC	MRE11	RAD51C*	VHL		KRTAP2-1	REG3A	
MED12			FAM135B	PIK3CB		PIK3CA		CDC73	FANCD2	MSH2	RAD51D*	WT1		KRTAP6-2	REG3G	
MYO1D1			FGFR1	PIK3R2		PIK3CB		CDH1	FANCE	MSH3	RAD52	XRCC2		LRRC7	RPTN	
NSD2			FGFR2	PIM1		PPARG		CDH10	FANCF	MSH6	RAD54L*	XRCC3		MARCO	RUND3B	
NT5C2			FGFR3	PLCG1		PRKACA		CDK12*	FANCG	MTAP	RASA1	ZFHX3		NLRCS	SH3RF2	
NTRK2			FGFR4	PPP2R1A		PRKACB		CDKN1A	FANCI	MUTHY	RASA2	ZMYM3		NOLA	SLC15A2	
NUP93			FLT3	PPP6C		RAF1		CDKN1B	FANCL*	NBN*	RB1	ZRSR2		NRXN1	SLC8A1	
PAX5			FLT4	PRKACA		RARA		CDKN2A	FANCM	NCOR1	RBM10			NYAP2	SYT10	
PIK3CD			FOXA1	PTPN11		RELA		CDKN2B	FAT1	NF1	RECQL4			OR10G8	SYT16	
PIK3CG			GATA2	PXDNL		RET		CDKN2C	FBXW7	NF2	RNA5H2A			OR2G6	TAPBP	
PTPRD			GNAS	RAC1		ROS1		CHEK1*	FUBP1	NOTCH1	RNA5H2B			OR2L13	TOP2A	

*Geni HRR implicati nella perdita di eterozigotà (LOH). Tabella riadattata da OncoPrint™ Comprehensive Assay Plus.

Indicazioni per il test Onconext® Precision Tissue

Il test **Onconext® Precision Tissue** viene somministrato a pazienti oncologici al fine di identificare una terapia personalizzata sulla base delle caratteristiche genomiche del tumore e in accordo con le linee guida del settore. Inoltre, essendo un'analisi genomica ad ampio spettro, permette, in caso di pregressi fallimenti terapeutici, di selezionare farmaci mirati in base alla caratterizzazione genomica del campione biotico.

È possibile scegliere diversi pannelli:

- a) **Onconext® Precision Tissue**: Valutazione di >500 geni + 49 geni di fusione + HRR genes + CNV + SNV + TMB + MSI
- b) **Immunoistochimica PDL-1**: Valutazione immunoistochimica (IHC) dell'antigene PDL-1 come marker di risposta all'immunoterapia (*da richiedere qualora ritenuto necessario*)
- c) **Immunopanel**, comprensivo di:
 - Immunoistochimica PDL-1
 - Immunoistochimica mismatch repair: MLH1, MSH2, MSH6, PMS2
 - Instabilità dei microsatelliti

La soluzione analitica al punto b) è consigliata in caso di materiale biotico scarso o insufficiente per l'indagine genomica completa, al fine di valutare almeno la risposta agli inibitori del checkpoint (immunoterapia).

Risultati del test Onconext® Precision Tissue

Il test Onconext® Tissue Precision identifica il profilo genomico del campione tumorale oggetto di analisi per le alterazioni genomiche descritte in tabella 1.

L'interpretazione del risultato viene modulata tenendo conto della personale storia clinica del paziente e allo specifico pattern mutazionale riscontrato. Sulla base delle mutazioni rilevate nel DNA tumorale, è dunque fornita un'indicazione sulla terapia a maggiore efficacia in base alla profilazione genomica del tumore, unitamente a potenziali resistenze e/o sensibilità terapeutiche. In caso di assenza di alterazioni di potenziale clinico noto e presenza di mutazioni a potenziale beneficio clinico, il risultato descriverà i **trial clinici** disponibili in base alle alterazioni genomiche riscontrate.

Occasionalmente, il test potrebbe produrre un risultato **non conclusivo**, perché il campione non soddisfa i requisiti minimi di qualità necessari per poter procedere all'analisi e, quindi, alla relativa analisi del dato e all'emissione del referto.

Metodi del test Onconext® Precision Tissue

Per il processamento del test **Onconext® Precision Tissue** viene utilizzato il kit commerciale OncoPrint™ Comprehensive Assay Plus di ThermoFisher Scientific secondo il manuale d'uso.

L'analisi del dato viene effettuata mediante Ion Reporter™ Software e il referto redatto tramite il software OncoPrint Reporter di ThermoFisher Scientific.

Le varianti sono riportate secondo la nomenclatura HGVS (www.hgvs.org/mutnomen) e classificate secondo il sistema di classificazione AMP in livelli IA, IB, IIC, IID, III e IV. Questi livelli sono stratificati in base all'utilità clinica (per il processo decisionale clinico per quanto riguarda la diagnosi, la prognosi, le opzioni di trattamento e lo stato di portatore) e ai dati precedentemente riportati nella letteratura medica. Le varianti trovate in gnomAD (<https://gnomad.broadinstitute.org/>) che hanno una frequenza allelica nella popolazione generale $\geq 1\%$ (eccetto quelle che in ClinVar sono indicate come clinicamente rilevanti) sono classificate come varianti note.

- Le **varianti** vengono filtrate per eliminare le varianti di bassa qualità, gli errori di sequenziamento e le varianti germinali, ed infine annotate.

- Questo test si applica ai pannelli di sequenziamento per il rilevamento di varianti somatiche in pazienti oncologici e non è valido per gli studi di varianti germinali, sequenziamento dell'esoma o sequenziamento dell'intero genoma.

- Verranno refertate solo le mutazioni non benigne rilevate nei geni studiati (a condizione che la variante sia adeguatamente coperta).
 - Il pannello analizzato si concentra sulle regioni codificanti dei geni specificati, per cui non vengono identificate le varianti introniche profonde e le varianti nelle regioni regolatorie.
 - Omopolimeri, espansioni di triplette e regioni ad alta omologia con altre regioni genomiche, come pseudogeni o duplicazioni geniche, possono portare a risultati falsi positivi e/o falsi negativi a causa di letture non allineate.
 - La sensibilità analitica potrebbe essere compromessa da una scarsa frazione di DNA tumorale (almeno 20%) o dalla presenza di mutazioni nei siti di ibridazione dei primer.
 - Questo test non rileva alterazioni strutturali complesse.
 - È possibile che varianti patogenetiche possano non essere identificate a seguito di filtri specifici nell'elaborazione dei dati, specialmente se ad alta complessità. Tuttavia, i parametri dello strumento sono stati ottimizzati per massimizzare la specificità e la sensibilità analitica.
- La sensibilità del test **Onconext® Precision Tissue** è > 93% e la specificità > 96.6.
- Sia i risultati positivi sia i risultati negativi devono essere interpretati nel contesto delle informazioni cliniche e degli altri risultati di laboratorio; un risultato positivo, anche se altamente suggestivo di un processo maligno, non deve essere utilizzato come unico criterio diagnostico.

Limiti del test Onconext® Precision Tissue

- Verranno refertate esclusivamente le mutazioni che nel campione presentano una frequenza $\geq 5\%$.
- Questo test non rileva le inserzioni/delezioni complesse e le alterazioni strutturali complesse. Anche le mutazioni situate al di fuori delle regioni target non verranno rilevate.
- Alcune regioni del DNA potrebbero essere escluse a causa di potenziali errori analitici di mappatura dovuti all'omologia di sequenza con altre regioni genomiche.
- L'interpretazione delle mutazioni genetiche si basa sulle più recenti conoscenze disponibili al momento dell'analisi. Tale interpretazione potrebbe cambiare in futuro con l'acquisizione di nuove informazioni scientifiche e mediche sulla struttura del genoma ed influire sulla valutazione stessa delle mutazioni.
- Alcune di queste mutazioni potrebbero non essere ancora state identificate o validate dalla comunità scientifica e quindi non essere riportate come patogenetiche al momento dell'analisi.

Tempi di Refertazione

I tempi stimati di refertazione sono di circa **30 giorni** lavorativi. I tempi di refertazione sopra indicati, tuttavia, non sono perentori e potrebbero prolungarsi in caso di ripetizioni dell'esame, risultati non ottimali, approfondimenti dell'esame o dubbi interpretativi.

Bibliografia

- 1) **S.Tomlins et al.** "PCR-based Comprehensive Genomic Profiling: Feasibility From >20,000 Tumor Tissues Specimens and Predicted Impact on Actionable Biomarker Identification Versus Hybrid Capture and Plasma". Strata Oncology (Abstract 3574-ASCO-2020).
- 2) **Keith T Flaherty et al.** Molecular Landscape and actionable alterations in a Genomically Guided Cancer Clinical Trial: National Cancer Institute Molecular Analysis for Therapy Choice (NCI-MATCH). J Clin Oncol 38.2020 by American Society of Clinical Oncology.
- 3) **Rizvi et al.** Science 2015 348(6230), Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer.
- 4) **Snyder et al.** N Engl J Med. 2014 371(23), Genetic basis for clinical response to CTLA-4 blockade in melanoma.
- 5) **Chalmers et al.** Genome Medicine 2017 9:34, Analysis of 100,000 human cancer genomes reveals the landscape of tumor mutational burden.