

## INFORMATIVA Onconext® Precision Liquid

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 Liquid

Il pannello **Onconext® Precision Liquid** permette, con un singolo test, di tracciare il profilo genomico del tumore basato sull'analisi di DNA di più di 500 geni a partire da sangue periferico (biopsia liquida) (Tab.1). Il pannello **Onconext® Precision Liquid** permette, con un singolo test, di valutare una vasta gamma di varianti e biomarcatori comunemente mutati in numerosi tipi di cancro. Il test analizza oltre 523 geni, per l'identificazione di varianti a singolo nucleotide (SNV, Single Nucleotide Variant), inserzioni/delezioni (indel), variazioni del numero di copie (CNV, Copy Number Variation), fusioni geniche, e per l'identificazione dei biomarcatori di instabilità microsatellitare (MSI, Microsatellite Instability) e di carico mutazionale del tumore (TMB, Tumor Mutational Burden)<sup>1-4</sup>.

Tab 1: Geni investigati in TruSight Oncology 500 ctDNA

|         |          |         |         |         |        |           |          |         |        |          |         |        |         |         |          |
|---------|----------|---------|---------|---------|--------|-----------|----------|---------|--------|----------|---------|--------|---------|---------|----------|
| ABL1    | BCL10    | CD79B   | DAXX    | ERCC5   | FGF3   | GNAQ      | GSK3B    | KDR     | MDM4   | NFKBIA   | PGR     | PTCH1  | RPS6KA4 | SOX2    | TNFAIP3  |
| ABL2    | BCL2     | CDC73   | DCUN1D1 | ERG     | FGF4   | GNAS      | H3F3A    | KEAP1   | MED12  | NKX2-1   | PHF6    | PTEN   | RPS6KB1 | SOX9    | TNFRSF14 |
| ACVR1   | BCL2L1   | CDH1    | DDR2    | ERRF1   | FGF5   | GPR124    | IGF1R    | KEL     | MEF2B  | NKX3-1   | PHOX2B  | PTPN11 | RP56KB2 | SPEN    | TOP1     |
| ACVR1B  | BCL2L1   | CDK12   | DDX41   | ESR1    | FGF6   | GPS2      | IGF2     | KIF5B   | MEN1   | NOTCH1   | PIK3C2B | PTPRD  | RPTOR   | SPOP    | TOP2A    |
| AKT1    | BCL2L2   | CDK4    | DHX15   | ETS1    | FGF7   | GREM1     | IKBKE    | KIT     | MET    | NOTCH2   | PIK3C2G | PTPRS  | RUNX1   | SPTA1   | TP53     |
| AKT2    | BCL6     | CDK6    | DICER1  | ETV1    | FGFR1  | GRIN2A    | IKZF1    | KLF4    | MGA    | NOTCH3   | PIK3C3  | PTPR   | RUNX1T1 | SRC     | TP63     |
| AKT3    | BCOR     | CDK8    | DIS3    | ETV4    | FGFR2  | GRM3      | IL10     | KLHL6   | MITF   | NOTCH4   | PIK3CA  | QKI    | RYBP    | SRSF2   | TRAF2    |
| ALK     | BCORL1   | CDKN1A  | DNAJB1  | ETV5    | FGFR3  | H3F3B     | IL7R     | KMT2B   | MLH1   | NPM1     | PIK3CB  | RAB35  | SDHA    | STAG1   | TRAF7    |
| ALOX12B | BCR      | CDKN1B  | DNMT1   | ETV6    | FGFR4  | H3F3C     | INHBA    | KMT2C   | MLL    | NRAS     | PIK3CD  | RAC1   | SDHAF2  | STAG2   | TSC1     |
| ANKRD11 | BIRC3    | CDKN2A  | DNMT3A  | EWSR1   | FH     | HGF       | HRAS     | KMT2D   | MLL2   | NRG1     | PIK3CG  | RAD21  | SDHB    | STAT3   | TSC2     |
| ANKRD26 | BLM      | CDKN2B  | DNMT3B  | EZH2    | FLCN   | HIST1H1C  | HSD3B1   | KRAS    | MPL    | NSD1     | PIK3R1  | RAD50  | SDHC    | STAT4   | TSHR     |
| APC     | BMPR1A   | CDKN2C  | DOT1L   | FAM123B | FLI1   | HIST1H2BD | HSP90AA1 | LAMP1   | MRE11A | NTRK1    | PIK3R2  | RAD51  | SDHD    | STAT5A  | U2AF1    |
| AR      | BRAF     | CEBPA   | E2F3    | FAM175A | FLT1   | HIST1H3A  | ICOSLG   | LATS1   | MSH2   | NTRK2    | PIK3R3  | RAD51B | SETBP1  | STAT5B  | VEGFA    |
| ARAF    | BRCA1a   | CENPA   | EED     | FAM46C  | FLT3   | HIST1H3B  | ID3      | LATS2   | MSH3   | NTRK3    | PIM1    | RAD51C | SETD2   | STK11   | VHL      |
| ARFRP1  | BRCA2a   | CHD2    | EGF17   | FANCA   | FLT4   | HIST1H3C  | IDH1     | LMO1    | MSH6   | NUP93    | PLCG2   | RAD51D | SF3B1   | STK40   | VTCN1    |
| ARID1A  | BRD4     | CHD4    | EGFR    | FANCC   | FOXA1  | HIST1H3D  | IDH2     | LRP1B   | MST1   | NUTM1    | PLK2    | RAD52  | SH2B3   | SUFU    | WISP3    |
| ARID1B  | BRIP1    | CHEK1   | EIF1AX  | FANCD2  | FOXL2  | HIST1H3E  | IFNGR1   | LYN     | MST1R  | PAK1     | PMAIP1  | RAD54L | SH2D1A  | SUZ12   | WT1      |
| ARID2   | BTG1     | CHEK2   | EIF4A2  | FANCE   | FOXO1  | HIST1H3F  | INHBA    | LZTR1   | MTOR   | PAK3     | PMS1    | RAF51  | SHQ1    | SYK     | XIAP     |
| ARID5B  | BTK      | CIC     | EIF4E   | FANCF   | FOXP1  | HIST1H3G  | INPP4A   | MAGI2   | MUTYH  | PAK7     | PMS2    | RANBP2 | SLIT2   | TAF1    | XPO1     |
| ASXL1   | C11orf30 | CREBBP  | EML4    | FANCG   | FRS2   | HIST1H3H  | INPP4B   | MALT1   | MYB    | PALB2    | PNRC1   | RARA   | SLX4    | TBX3    | XRCC2    |
| ASXL2   | CALR     | CRKL    | EP300   | FANCI   | FUBP1  | HIST1H3I  | INSR     | MAP2K1  | MYC    | PARK2    | POLD1   | RASA1  | SMAD2   | TCEB1   | YAP1     |
| ATM     | CARD11   | CRF2    | EPCAM   | FANCL   | FYN    | HIST1H3J  | IRF2     | MAP2K2  | MYCL1  | PARP1    | POLE    | RB1    | SMAD3   | TCF3    | YES1     |
| ATR     | CASP8    | CSF1R   | EPHA3   | FAS     | GABRA6 | HIST2H3A  | IRF4     | MAP2K4  | MYCN   | PAX3     | PPARG   | RBM10  | SMAD4   | TCF7L2  | ZBTB2    |
| ATRX    | CBFB     | CSF3R   | EPHA5   | FAT1    | GATA1  | HIST2H3C  | IRS1     | MAP3K1  | MYD88  | PAX5     | PPM1D   | RECQL4 | SMARCA4 | TERC    | ZBTB7A   |
| AURKA   | CBL      | CSNK1A1 | EPHA7   | FBXW7   | GATA2  | HIST2H3D  | IRS2     | MAP3K13 | MYO1D  | PAX7     | PPP2R1A | REL    | SMARCB1 | TERT    | ZFHX3    |
| AURKB   | CCND1    | CTCF    | EPHB1   | FGF1    | GATA3  | HIST3H3   | JAK1     | MAP3K14 | NAB2   | PAX8     | PPP2R2A | RET    | SMARCD1 | TET1    | ZNF217   |
| AXIN1   | CCND2    | CTLA4   | ERBB2   | FGF8    | GATA4  | HLA-A     | JAK2     | MAP3K4  | NBN    | PBRM1    | PPP6C   | RFWD2  | SMC1A   | TET2    | ZNF703   |
| AXIN2   | CCND3    | CTNNA1  | ERBB3   | FGF9    | GATA6  | HLA-B     | JAK3     | MAPK1   | NCOA3  | PDCD1    | PRDM1   | RHEB   | SMC3    | TFE3    | ZRSR2    |
| AXL     | CCNE1    | CTNNB1  | ERBB4   | FGF10   | GEN1   | HLA-C     | JUN      | MAPK3   | NCOR1  | PDCD1LG2 | PREX2   | RHOA   | SMO     | TFRC    |          |
| B2M     | CD274    | CUL3    | ERCC1   | FGF14   | GID4   | HNF1A     | KAT6A    | MAX     | NEGR1  | PDGFRA   | PRKAR1A | RICTOR | SNCAIP  | TGFBR1  |          |
| BAP1    | CD276    | CUX1    | ERCC2   | FGF19   | GLI1   | HNRNPK    | KDM5A    | MCL1    | NF1    | PDGFRB   | PRKCI   | RIT1   | SOCS1   | TGFBR2  |          |
| BARD1   | CD74     | CXCR4   | ERCC3   | FGF2    | GNA11  | HOXB13    | KDM5C    | MDC1    | NF2    | PKD1     | PRKDC   | RNF43  | SOX10   | TMEM127 |          |
| BBC3    | CD79A    | CYLD    | ERCC4   | FGF23   | GNA13  | IGF1      | KDM6A    | MDM2    | NFE2L2 | PDPK1    | PRSS8   | ROS1   | SOX17   | TMPRSS2 |          |

Il contenuto in grigio viene analizzato per il rilevamento CNV. a.) Grandi riarrangiamenti (CNV a livello di esone) rilevati per i geni BRCA1 e BRCA2.

### Indicazioni per il test Onconext® Precision Liquid

Il test **Onconext® Precision Liquid** è indicato per pazienti oncologici al fine di identificare, mediante il DNA tumorale circolante (ctDNA), una terapia personalizzata sulla base delle caratteristiche genetiche del tumore 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 ctDNA.

Può essere consigliato in caso di materiale biotipico scarso o assente, per valutazione di efficacia terapeutica, per monitoraggio di recidiva di malattia.

### Risultati del test Onconext® Precision Liquid

Il test **Onconext® Precision Liquid** fornisce il profilo genomico del tumore valutando la presenza, nel ctDNA analizzato, delle alterazioni genomiche a carico dei geni descritti 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 circolante 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 fornire un risultato **non conclusivo a seguito di mancato raggiungimento dei criteri minimi di qualità analitica**.

### Metodi del test Onconext® Precision Liquid

Per il processamento del test **Onconext® Precision Liquid** viene utilizzato il kit commerciale **Illumina TruSight™ Oncology 500 ctDNA** (TSO500 ctDNA) seguendo il manuale d'uso. I file di sequenziamento vengono analizzati con il software locale Illumina TSO500 v2.2 Local App ed una pipeline di analisi personalizzata all'interno della piattaforma software Clinical Genomics Workspace di PierianDx<sup>7</sup>, che filtra, mappa e allinea le letture ed esegue la chiamata di varianti utilizzando hg19/GRCh37.

Le **varianti** sono riportate secondo la nomenclatura HGVS ([www.hgvs.org/mutnomen](http://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 in letteratura. 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 varianti 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 circolante 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.

Tramite il test **Onconext® Precision Liquid** si ottengono prestazioni altamente accurate nell'identificazione di mutazioni, con una **sensibilità** analitica  $> 96\%$  e una **specificità** analitica superiore al 99,9995%.

Sia i risultati positivi che quelli 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 Liquid**

- Verranno refertate esclusivamente le mutazioni che nel campione presentano una frequenza  $\geq 1\%$ .
- 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 varianti 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 varianti.
- Alcune di queste varianti 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. **Tray N, Weber JS, Adams S.** Predictive Biomarkers for Checkpoint Immunotherapy: Current Status and Challenges for Clinical Application. *Cancer Immunol Res.* 2018;6(10):1122-1128. doi:10.1158/2326-6066.CIR-18-0214
2. **Samstein RM, Lee CH, Shoushtari AN, et al.** Tumor mutational load predicts survival after immunotherapy across multiple cancer types. *Nat Genet.* 2019;51(2):202-206. doi:10.1038/s41588-018-0312-8
3. **U.S. Food & Drug Administration.** FDA Approves FirstLine Immunotherapy for Patients with MSI-H/dMMR Metastatic Colorectal Cancer. [fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-line-immunotherapy-patients-msi-hdmmr-metastatic-colorectal-cancer](https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-line-immunotherapy-patients-msi-hdmmr-metastatic-colorectal-cancer).
4. **U.S. Food & Drug Administration.** FDA approves pembrolizumab for adults and children with TMB-H solid tumors. [fda.gov/drugs/drug-approvals-and-databases/fda-approves-pembrolizumab-adults-and-children-tmb-h-solid-tumors](https://www.fda.gov/drugs/drug-approvals-and-databases/fda-approves-pembrolizumab-adults-and-children-tmb-h-solid-tumors).
5. **Illumina.** Analysis of TMB and MSI Status with TruSight Oncology 500. [illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/appnotes/trusight-oncology-500-tmb-analysis-1170-2018-009.pdf](https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/appnotes/trusight-oncology-500-tmb-analysis-1170-2018-009.pdf).
6. **Beroukhi R, Mermel CH, Porter D, et al.** The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature.* 2010;463(7283):899-905. doi:10.1038/nature08822
7. **Pierian.** Genomic Knowledgebase. [pieriandx.com/genomicknowledgebase](https://www.pieriandx.com/genomicknowledgebase).