

**Massimo Negrini -
Università di Ferrara**

***Dalla biopsia liquida al paziente:
il monitoraggio della malattia in
corso di tumori solidi***



**Convegno Regionale SIES
Delegazione Emilia Romagna**

Biopsia liquida:

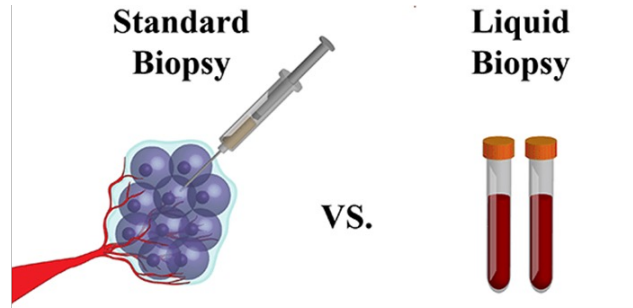
**CHE TRAFFICO
IN PERIFERIA!**

Bologna

28 Febbraio – 1 Marzo 2025

Aula 1 – Complesso UniOne, Università di Bologna

Tissue biopsy vs Liquid biopsy



Tissue Biopsy

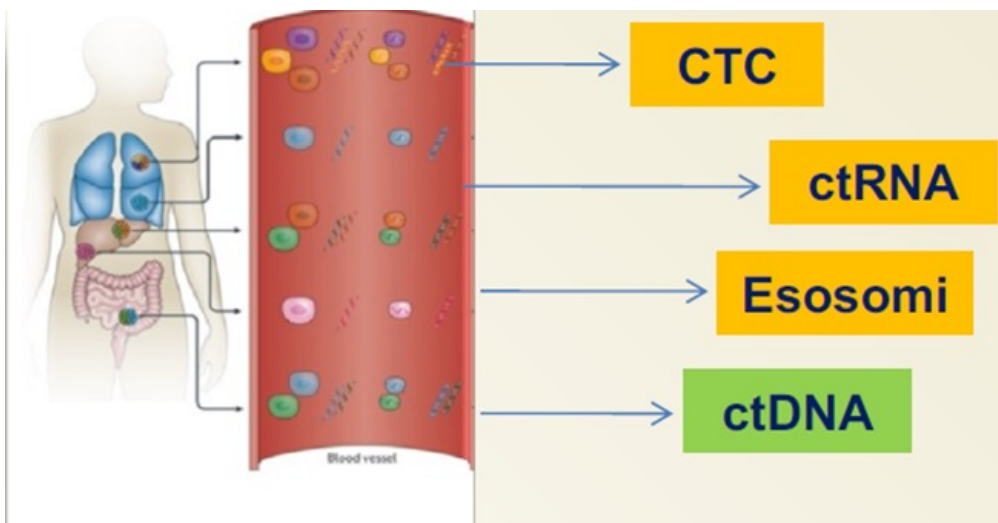
vs.

Liquid Biopsy

• Allows histological diagnosis and staging	• Does not allow tumor histotype specification and staging
• Often difficult and invasive	• Non-invasive procedure
• Not always representative for the entire variety of malignant clones: TUMOR HETEROGENEITY	• Representative of the different localization of the malignant clones: TUMOR HETEROGENEITY
• Multiple sampling are not always feasible	• Easily repeatable and highly reproducible
• Single snapshot over time and space	• Real-time monitoring of disease (MRD and PD)
• Still the gold standard for tumor characterization	• Lack of standardization, still used mainly in translational research

- Currently, cancer is diagnosed by clinical presentation and imaging confirmation
- For definitive diagnosis, pathologic analysis of tumor tissue is generally required.
- Tissue biopsy represents the “gold standard” also for molecular profiling
- It is essential in decision-making regarding treatment for malignant solid tumors
- Tissue biopsies are associated with limitations, including difficulty in getting samples and invasiveness.
- **Liquid biopsy can potentially overcome the limitations of traditional tissue-derived biomaterials**

Biopsia Liquida



Con il termine biopsia liquida si fa riferimento all'utilizzo di fluidi biologici come surrogato al tessuto neoplastico per ottenere informazioni utili ai fini diagnostici, prognostici o per predire la risposta alla terapia con terapie a bersaglio molecolare

Esiste una varietà di materiali per l'analisi di molecole rilasciate da cellule tumorali

Gli attuali metodi approvati per un uso clinico includono l'analisi di:

- DNA circolante (ctDNA >> Mutazioni)
- RNA circolante (ctRNA >> Fusioni)
- Cellule tumorali circolanti (CTCs)
- Esosomi / microvescicole
- microRNA

Circulating Tumor DNA (ctDNA): release in circulation

Different tissues

Tumor

Metastasis

Non-tumor tissue

Release of DNA

Apoptosis

Necrosis

Secretion

cfDNA vs. ctDNA

ctDNA fraction

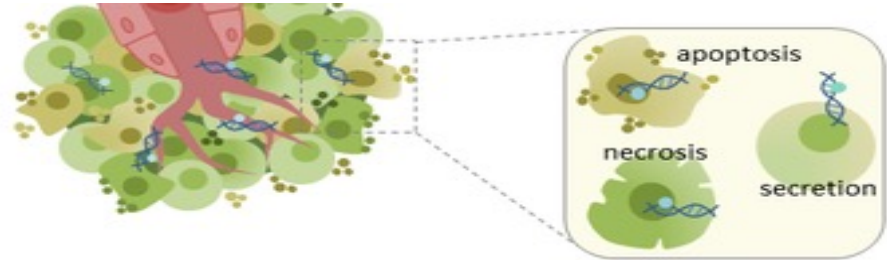
Low tumor fraction

<1%




>10%

High tumor fraction

Depending on tumor size, vascularity and location, the amount of ctDNA can range from < 0.01% to >10% of all DNA present in the plasma.



Methods in ctDNA / ctRNA analysis

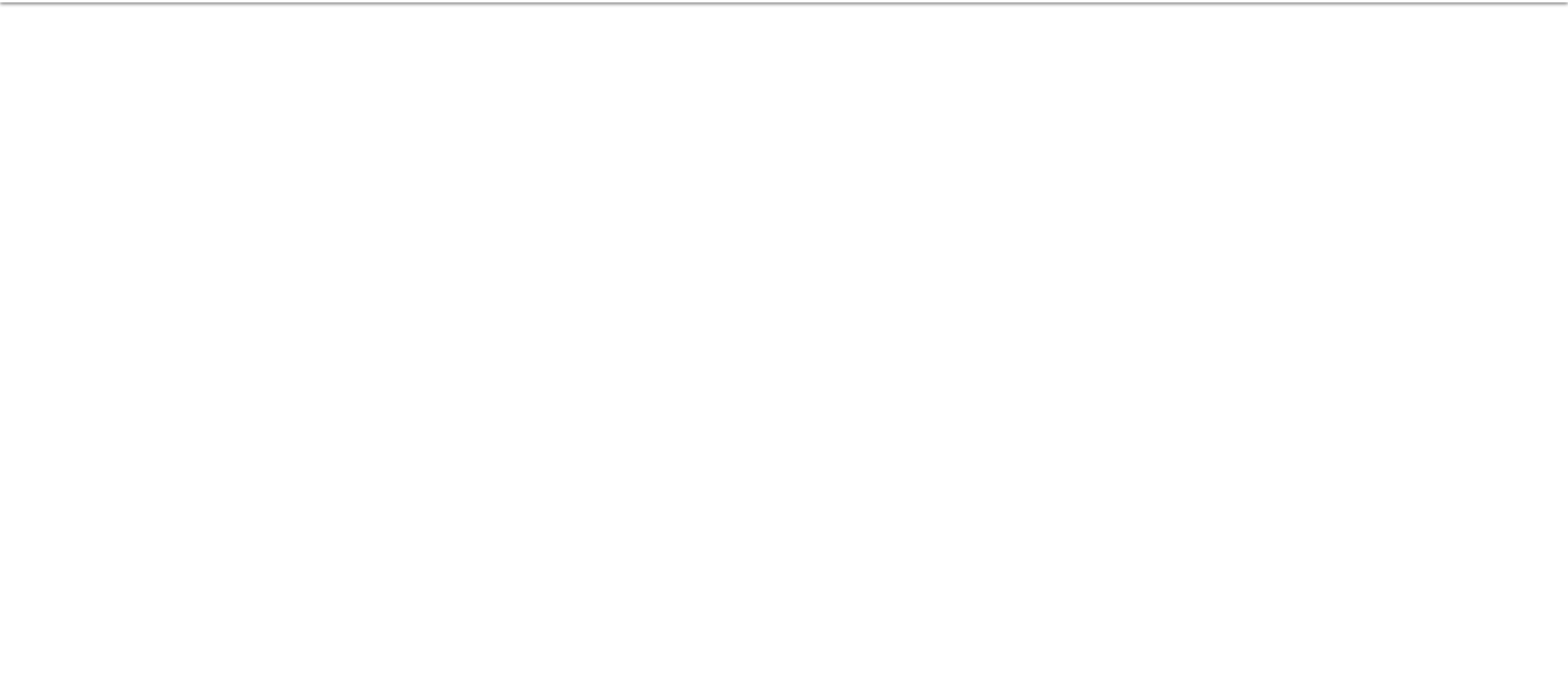
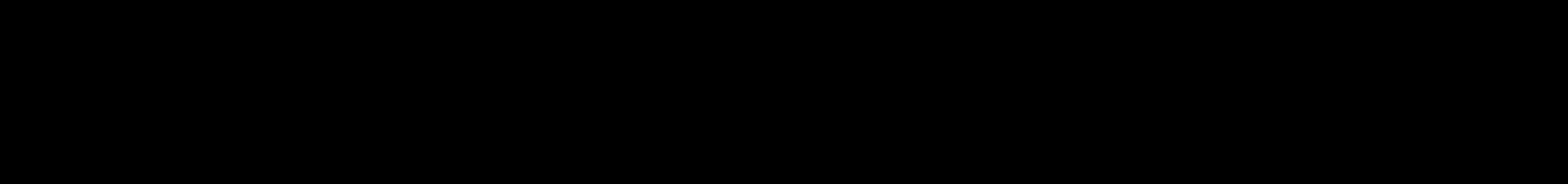
Real-Time PCR	Digital PCR	NGS
		
1%–5%	0.1%–1%	0.01%–5%
Only hotspot mutations (probe-based)	Only hotspot mutations (probe-based)	All the mutations present in the analyzed gene regions
		Recommended

LoD

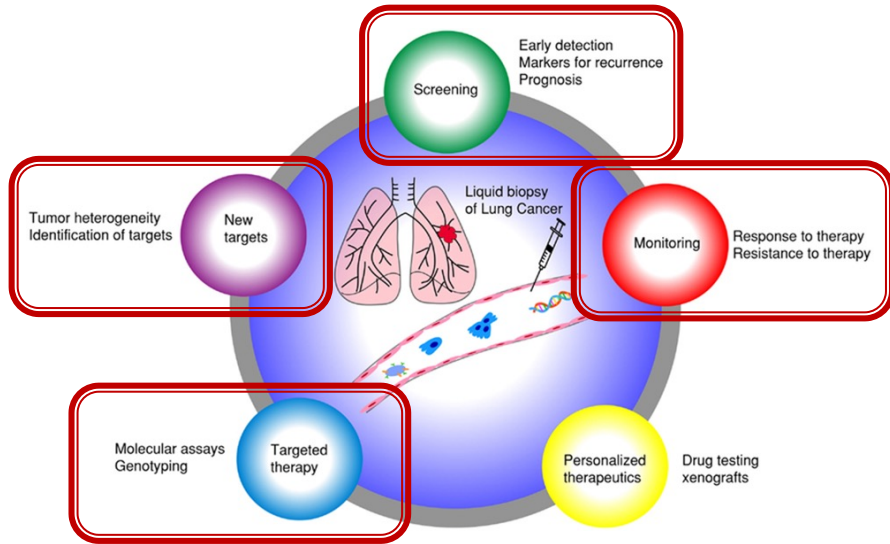
Methods in ctDNA / ctRNA analysis

Testing platform	Advantages	Disadvantages
<u>PCR based platforms</u> (for example: ARMS; BEAMing, ddPCR)	(I) Quick turnaround time; (II) high sensitivity and specificity; (III) relatively cheaper	(I) Can only detect a small number of known relevant mutations; (II) harder to detect copy number variations and gene fusions
<u>NGS based platforms</u> (for example: Tam-Seq, Ampli-Seq, CAPP-Seq, WES, WGS)	(I) Can detect a large number of mutations without limiting sequencing space; (II) easier to detect copy number variations and gene fusions	(I) Longer turnaround time; (II) expensive; (III) bioinformatics required to analyze results

PCR, polymerase chain reaction; NGS, next-generation sequencing; ARMS, amplification refractory mutation system; BEAMing, beads, emulsion, amplification, magnetics; CAPP-Seq, cancer personalized profiling by deep sequencing; ddPCR, droplet digital PCR; Tam-Seq, tagged-amplicon deep sequencing; WES, whole-exome sequencing; WGS, whole-genome sequencing; ctDNA, circulating tumor DNA.



ctDNA nella gestione dei pazienti oncologici



L'analisi ctDNA/ctRNA consente:

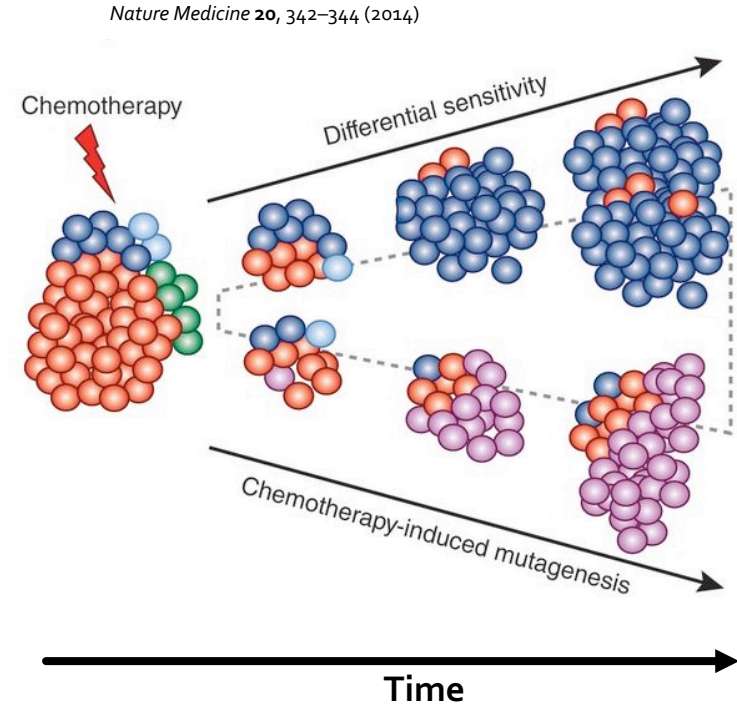
- Identificazione **alterazioni geniche in pazienti con tumore in stadio avanzato / metastatico**
- Valutazione dell'eterogeneità tumorale
- Evoluzione clonale
- Monitoraggio del trattamento

Gli usi emergenti includono:

- Rilevazione della malattia in fase iniziale (diagnosi precoce)

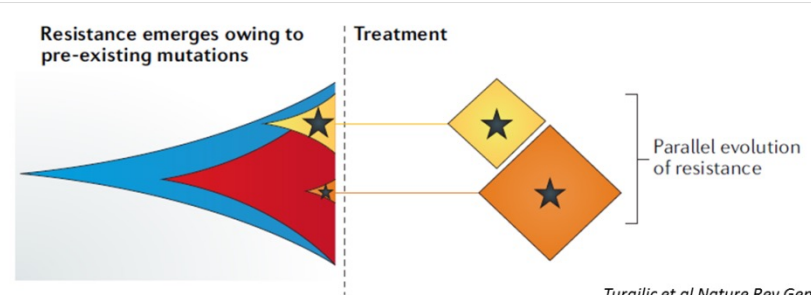
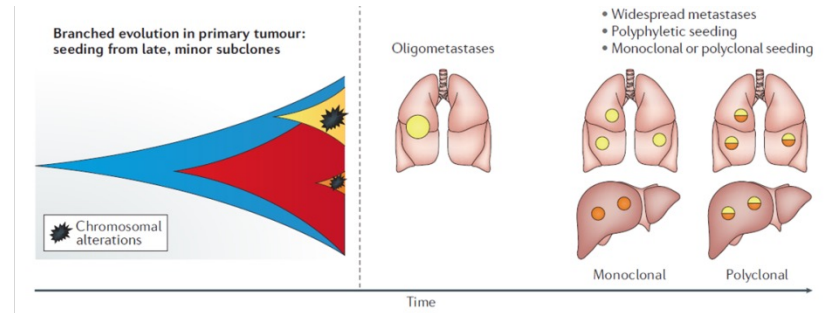
Tumor heterogeneity

- a major advantage of liquid biopsy compared to tissue biopsy, is the ability of capturing tumor heterogeneity.
- This is important, as tumor heterogeneity sets the conditions for selecting the «best-fit» clone



Tumor heterogeneity and therapy response

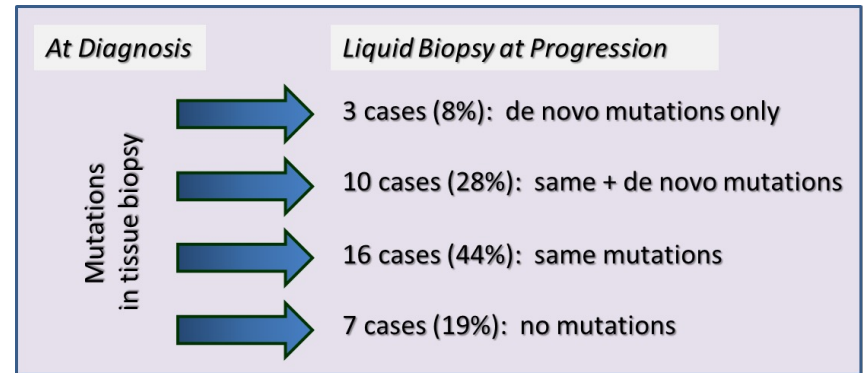
- a major advantage of liquid biopsy compared to tissue biopsy, is the ability of capturing tumor heterogeneity.
- This is important, as tumor heterogeneity sets the conditions for selecting the «best-fit» clone
- It represents the evolutionary framework in cancer progression that can lead to therapy failure



Eterogeneità tumorale e progressione

- In uno studio svolto su 57 pazienti affetti da NSCLC oncogene-addicted monitorati nel tempo mediante biopsia liquida (641 plasmi),
- nel corso di circa 3 anni abbiamo registrato 36 progressioni di malattia

- A progressione, abbiamo osservato diverse situazioni,



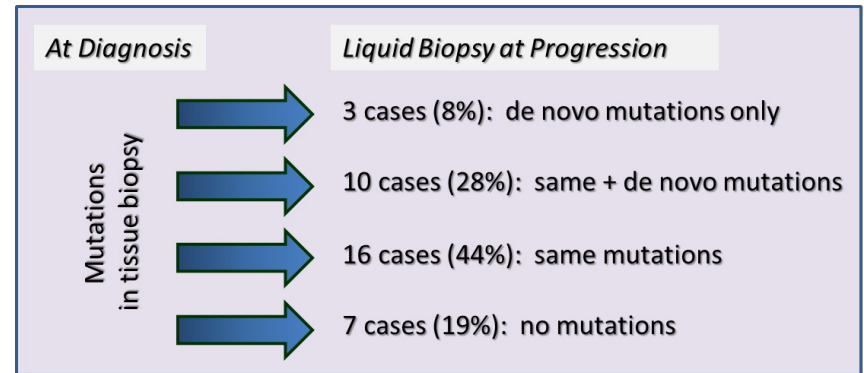
Lupini et al., IJMS, 2022

- **evidenza della eterogeneità tumorale responsabile della progressione**

Eterogeneità tumorale e progressione

- In uno studio svolto su 57 pazienti affetti da NSCLC oncogene-addicted monitorati nel tempo mediante biopsia liquida (641 plasmi),
- nel corso di circa 3 anni abbiamo registrato 36 progressioni di malattia

- A progressione, abbiamo osservato diverse situazioni,

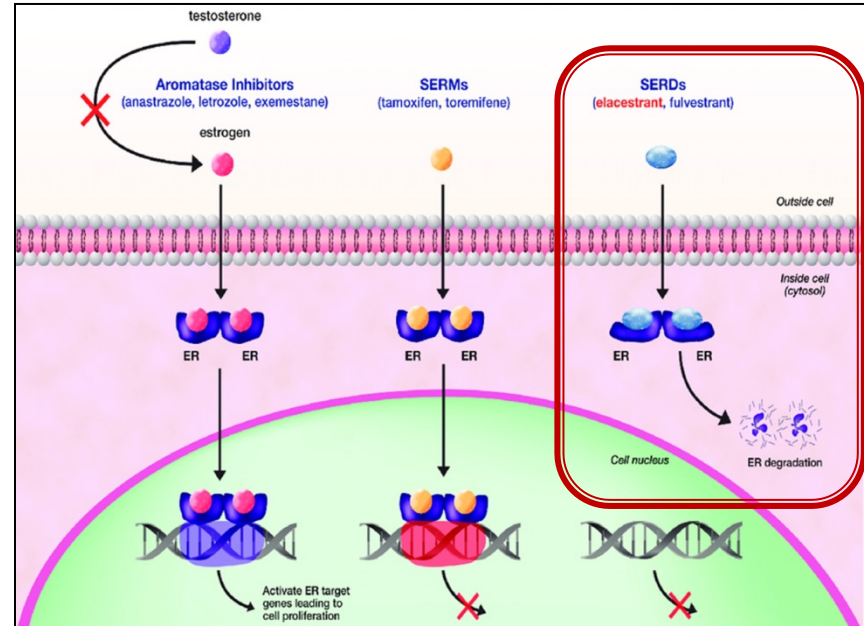


Lupini et al., IJMS, 2022

- In circa il 25% dei casi, l'informazione a consentito la scelta di altra terapia mirata

Liquid biopsy in breast cancer patients at progression

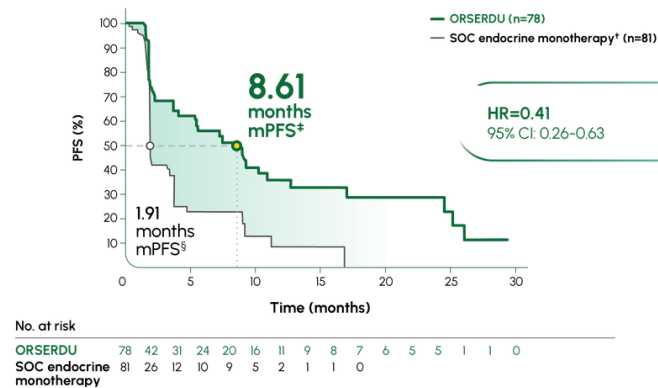
- Liquid biopsy is clinically approved in patients with Estrogen Receptor positive / HER2-negative breast cancer, at metastatic progression on endocrine therapy including CDK/4-6 inhibitors
- Liquid biopsy is indicated for the search of mutations in the ESR1 gene (encoding estrogen receptor alpha)
- ESR1 mutations are associated with endocrine resistance, which can be overcome by the use of **E**lacestrant.



Liquid biopsy in breast cancer patients at progression

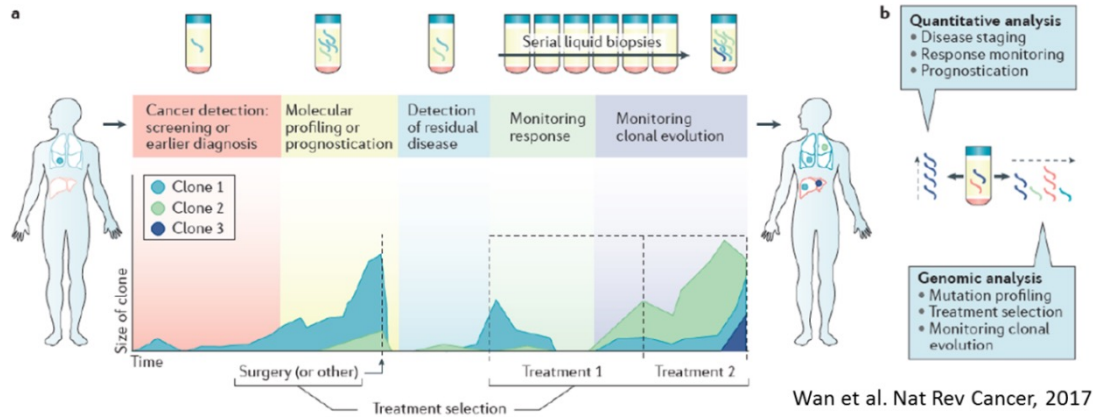
- Liquid biopsy is clinically approved in patients with Estrogen Receptor positive / HER2-negative breast cancer, at metastatic progression on endocrine therapy including CDK/4-6 inhibitors
- Liquid biopsy is indicated for the search of mutations in the ESR1 gene (encoding estrogen receptor alpha)
- ESR1 mutations are associated with endocrine resistance, which can be overcome by the use of **Elacestrant**.

POST HOC ANALYSIS: mPFS IN PATIENTS WITH ≥12 MONTHS PRIOR ET + CDK4/6i⁴



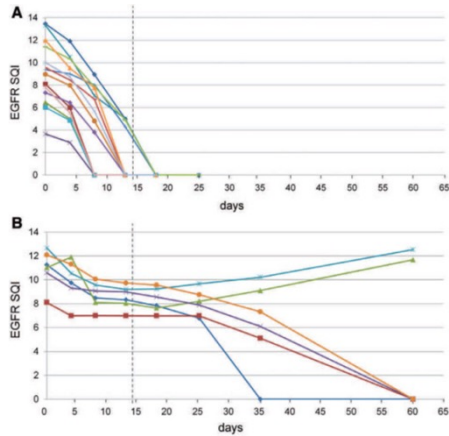
Monitoraggio Malattia nel tempo

- Altra caratteristica della biopsia liquida è perciò la possibilità di identificare variazioni nella eterogeneità genetica tumorale.



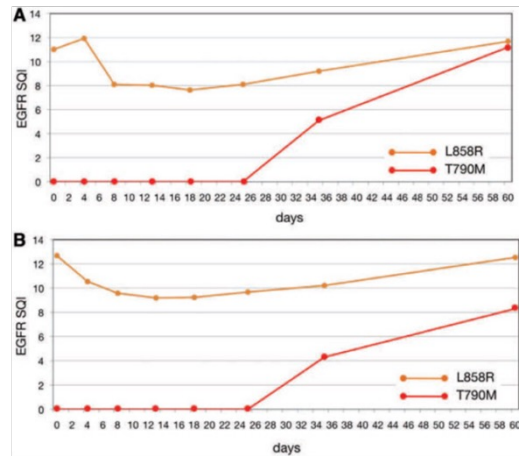
- Diversamente dalla biopsia tissutale, la biopsia liquida consente di monitorare la malattia nel tempo: ciò ha un impatto rilevante sulla gestione clinica del paziente oncologico

Risposta alla terapia in pazienti con NSCLC EGFR mutato, a progressione



Quantification of mutated *EGFR* DNA from plasma of 20 patients after initiation of *EGFR* TKI therapy reveals **RAPID and SLOW responders in 2 weeks**

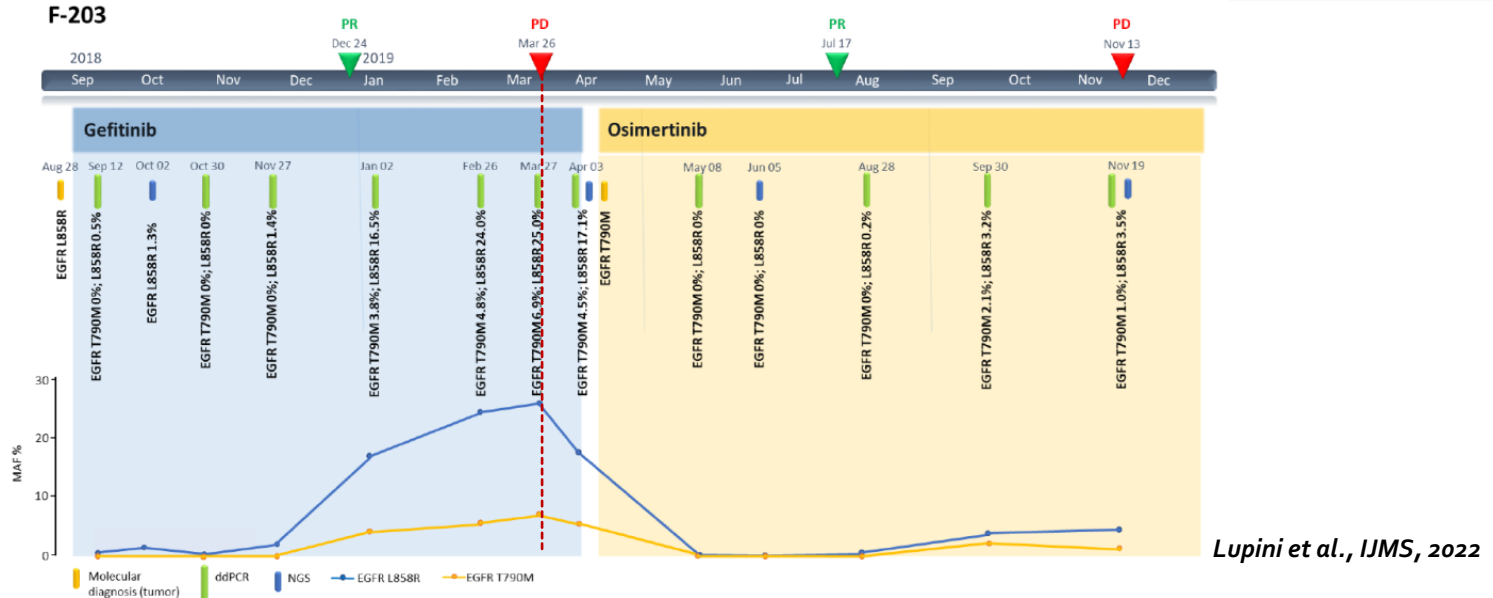
Marchetti et al. *Journal of Thoracic Oncology* 10, 1437-1443



failure to clear the initial *EGFR* mutated DNA (L858R) and the **emergence of T790M DNA during week 3** after initiating *EGFR* TKI treatment.

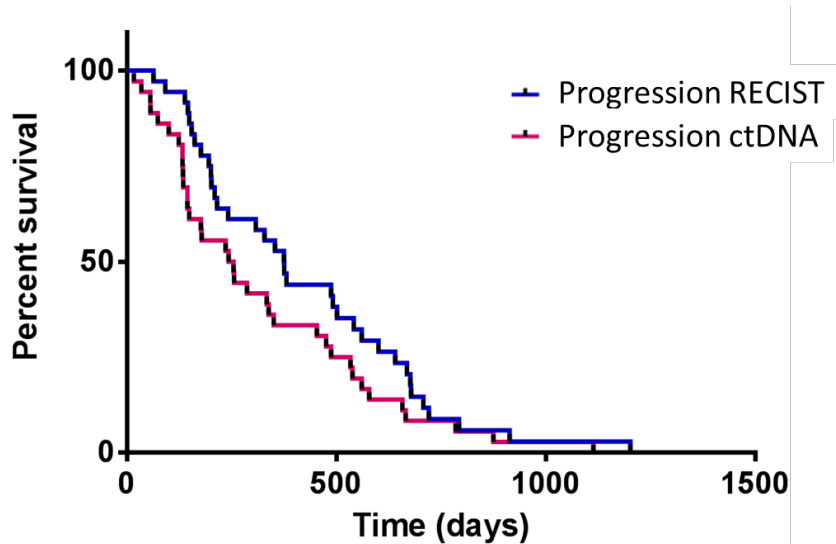
- Ciò ha implicazioni nella risposta alla terapia, che è spesso associata a variazioni di quantità di ctDNA rilevabili nel plasma del paziente
- Non solo, ma permette di riconoscere eventuali nuove varianti targettabili.
- In sintesi, offre la possibilità di scegliere la terapia giusta al momento giusto.

Risposta alla terapia: rilevanza della LB



In questo esempio di monitoraggio mediante biopsia liquida, si osserva anche che l'incremento del ctDNA precede l'evidenza RECIST di progressione di malattia

ctDNA anticipa RECIST a progressione



Lupini et al., IJMS, 2022

- Dal confronto dei dati a progressione abbiamo osservato che
- circa 80% dei casi mostra un incremento del ctDNA con una anticipazione di circa 80 giorni rispetto alla progressione evidenziata mediante TC/RMN

Biopsia liquida alla diagnosi ?

Liquid biopsy at diagnosis in NSCLC

Diagnostic algorithm for liquid biopsy use in treatment-naive advanced/metastatic NSCLC



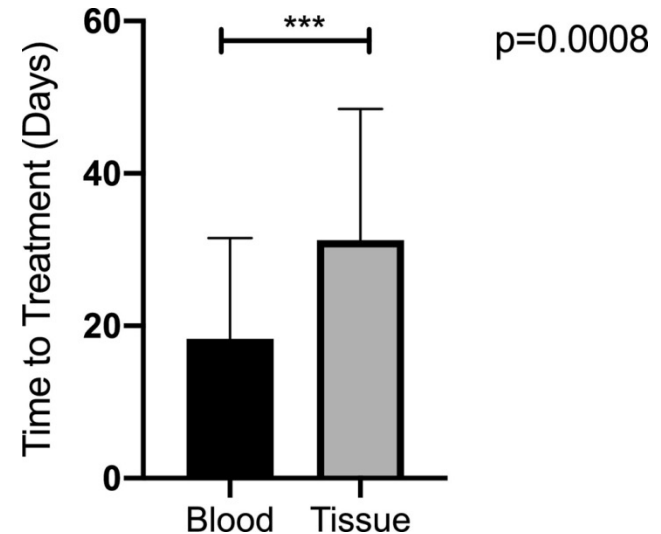
Advanced NSCLC with unknown genotype



Lo studio clinico NILE: *Plasma first?*

- Lo studio osservazionale prospettico NILE svolto in pazienti con NSCLC non squamoso di nuova diagnosi, ha dimostrato la non inferiorità della genotipizzazione tumorale basata sul ctDNA rispetto alla genotipizzazione basata sui tessuti per individuare alterazioni genomiche targettabili.
- Per i target approvati dalla FDA (EGFR, ALK, ROS1, BRAF) la concordanza è stata del 98,2% tra tessuto e ctDNA
- Il tempo di risposta del ctDNA è stato significativamente più veloce (9 vs. 15 giorni, $p < 0.0001$), il che ha comportato un tempo di trattamento significativamente più veloce per la profilazione basata sul sangue rispetto alla profilazione basata sui tessuti (mediana 18 vs. 31 giorni; $P = 0.0008$)
- Gli outcome terapeutici basati sulla profilazione genomica da plasma sono stati paragonabili ai risultati pubblicati della terapia mirata basata su profilazione tissutale

Clinical Lung Cancer 2022 2372-81DOI: (10.1016/j.clcc.2021.10.001)



Pertanto il "plasma-first approach" è una potenziale opzione da considerare in futuro

What next ?

Liquid biopsy in early stages of cancer?

- I pazienti con NSCLC in stadio iniziale (I, II e III resecabile) sono idonei alla chirurgia radicale, seguita o meno da terapia adiuvante sulla base della stadiazione TNM del tumore primario e dello stato mutazionale dell'EGFR.
- Nonostante l'intento curativo, la sopravvivenza complessiva a 5 anni dopo la chirurgia radicale è di circa il 32%.

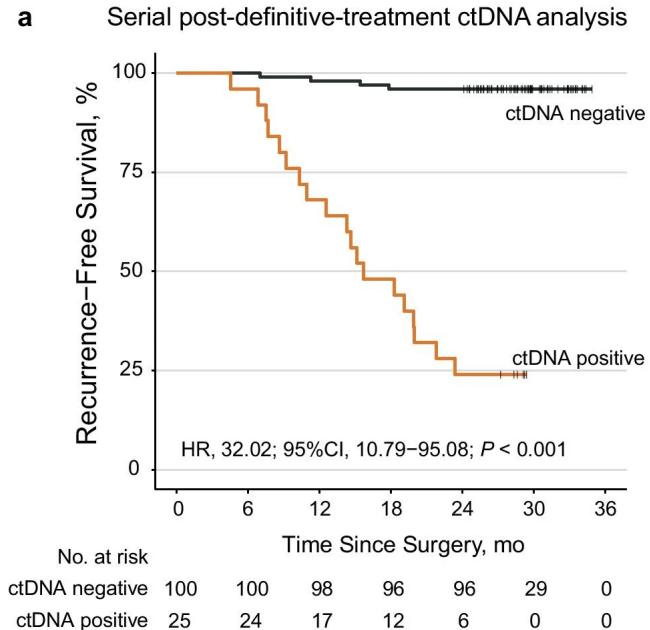
- **nella malattia in stadio iniziale**, una limitazione della biopsia liquida è che il **ctDNA è spesso non rilevabile a causa di quantità troppo basse**.

Ad esempio

- Con approcci che rivelano ctDNA allo 0.01-0.1%, Chabon et al. (Nature 580, 245–251; 2020) ha rivelato ctDNA nel 45% di 85 pazienti con NSCLC in stadio I-III.
- L'analisi di metilazione nel cfDNA in uno studio multicentrico su numerosi tipi di cancro (in oltre 10.000 pazienti) ha rivelato che la sensibilità per malattia in stadio I-III era di circa il 44% (Liu, et al. Ann. Oncol. 31, 745–759 (2020)).

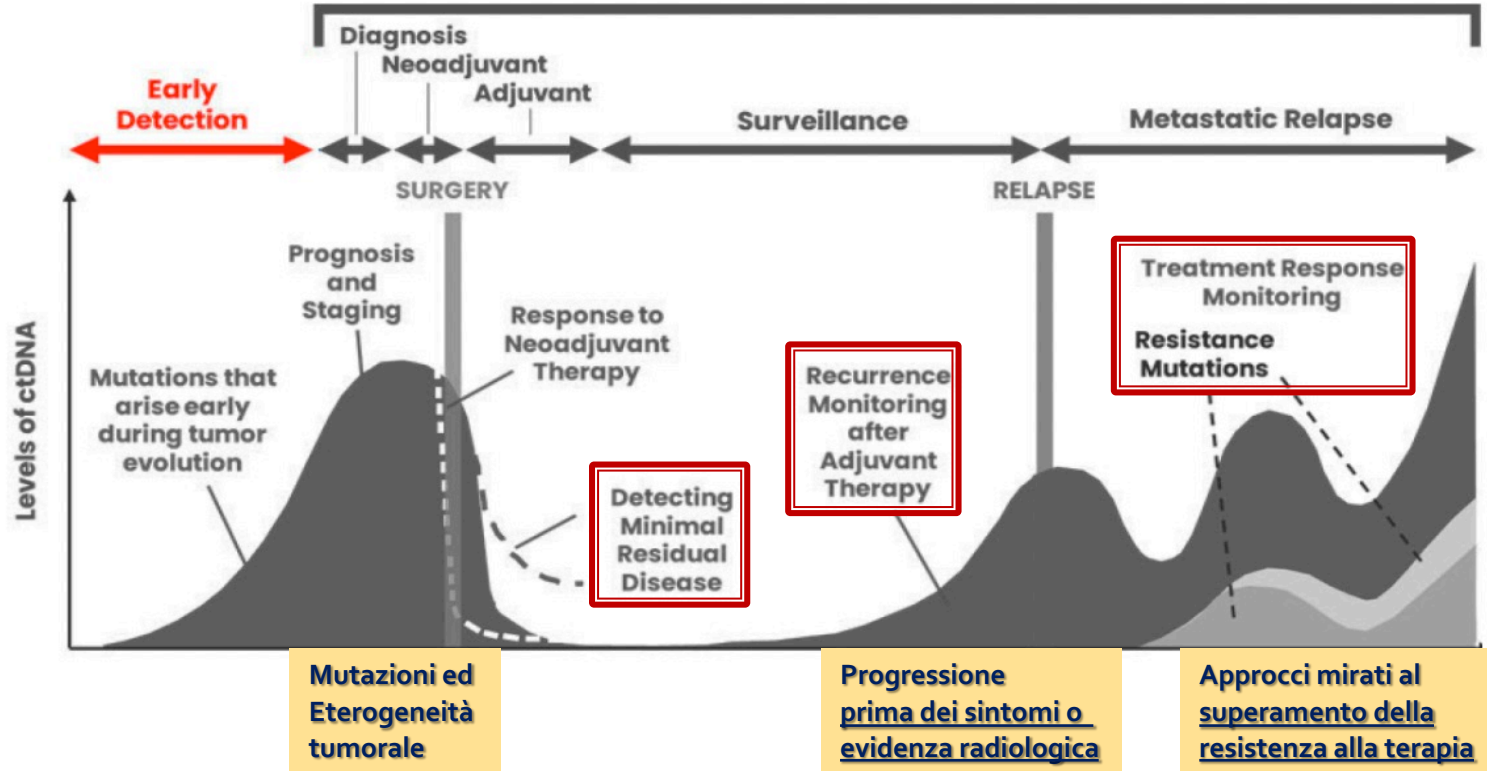
Colon ca stadio II

- Ma una utilità è stata evidenziata nel carcinoma del colon in stadio II
- In questi pazienti, l'importanza della chemioterapia adiuvante è dibattuta.
- È stato tuttavia dimostrato che la presenza di DNA tumorale circolante (ctDNA) dopo l'intervento chirurgico predice una sopravvivenza libera da recidiva inferiore, mentre la sua assenza predice un basso rischio di recidiva nei pazienti con CRC in stadio II-III,
- suggerendo che il ctDNA possa essere utilizzato per guidare il processo decisionale nella gestione terapeutica post-chirurgica.



Chen, G., et al. *J Hematol Oncol* 14, 80 (2021)

Opportunità per l'uso della biopsia liquida nel percorso clinico del paziente oncologico



Ringraziamenti

Dati riportati in questa presentazione sono stati possibili grazie a personale del laboratorio

- D'Abundo, Lucilla
- Callegari, Elisa
- Bassi, Cristian
- Lupini, Laura
- Michilli, Angelo
- Roncarati, Roberta
- Guerriero, Paola
- Saccenti, Elena
- Sabbioni, Silvia



Ed alla collaborazione di membri della

UOC di Oncologia, AOIFE

- Frassoldati, Antonio
- Calabrò, Luana
- Bronte, Giuseppe
- Lancia, Federica
- Fasano, Alessandra
- Fragale, Elisa
- Salamone, Andrea
- Cusi, Donato Michele

Gli studi sono stati supportati da:

- Ministero della Salute
- Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro
- Università di Ferrara



Ministero della Salute



UOC di Anatomia Patologica, AOIFE

- Lanza, Giovanni
- Gafà, Roberta
- Tagliatti, Valentina
- Maestri, Iva