

Profilazione genomica del NSCLC: confronto tra metodiche standard e test NGS

Carmine Pinto,¹ Nicola Normanno,² Claudio Jommi,³ Mattia Altini,⁴ Giovanni Ravasio⁵

¹ Head Medical Oncology - Clinical Cancer Centre, IRCCS - AUSL di Reggio Emilia

² Direttore Dipartimento Ricerca - Istituto Nazionale Tumori - IRCCS Fondazione Pascale, Napoli

³ Professor of Practice Government, Health and Not for profit Division SDA Bocconi School of Management

⁴ Direttore Sanitario - IRCCS IRST Istituto Romagnolo per lo Studio dei Tumori "Dino Amadori", Meldola (FC)

⁵ Direttore Editoriale Economia Sanitaria

Gli Autori ringraziano per il contributo all'analisi e al confronto sui temi:

Patrizia Popoli (Dir. Centro Nazionale Ricerca e Valutazione Preclinica e Clinica dei Farmaci - Istituto Superiore Sanità)

Mauro Biffoni (Dir. Dipartimento Oncologia e medicina molecolare - Istituto Superiore Sanità)

Anna Maria Marata (Coord. Commissione Regionale Farmaco, Regione Emilia-Romagna)

Maria Teresa Montella (Dir. Sanitario - IRCCS IRST Istituto Romagnolo Studio dei Tumori "Dino Amadori", Meldola - FC)

Claudia Rengucci (Resp. Processi tecnico-operativi diagnostica - IRCCS IRST Istituto Romagnolo Studio dei Tumori "Dino Amadori", Meldola - FC)

Anna Maria Rachiglio (Cell Biology and Biotherapy Unit - Istituto Nazionale Tumori - IRCCS Fondazione Pascale, Napoli)

Cristin Roma (Cell Biology and Biotherapy Unit - Istituto Nazionale Tumori - IRCCS Fondazione Pascale, Napoli)

Lucia Magnano (Area Farmaco e Dispositivi Medici, Regione Emilia-Romagna)

La profilazione genomica fornisce informazioni ampie sulle alterazioni molecolari coinvolte nello sviluppo delle neoplasie, permettendo di tracciare il profilo genetico-molecolare delle varie forme tumorali, al fine di trattare i pazienti con terapie personalizzate.

In questo scenario di grande sviluppo della medicina di precisione, un Gruppo di Lavoro multidisciplinare, anche attraverso il confronto con interlocutori pubblici e privati del nostro SSN, ha approntato un'analisi sugli aspetti clinici ed economici della profilazione genomica del NSCLC (non-small-cell lung cancer), tumore paradigmatico anche per la limitata disponibilità di campioni tissutali per l'esecuzione di diversi test di patologia molecolare predittiva. Neoplasia nella quale le tecnologie NGS (Next-Generation Sequencing) possono consentire la valutazione contemporanea di diverse alterazioni, individuandone alcune recentemente caratterizzate che non potrebbero essere rilevate con altri test.

L'analisi – impostata secondo le più recenti Linee Guida di AIOM per le neoplasie del polmone e Raccomandazioni per NGS di ESMO – ha raggruppato (in raccomandate, consigliate e indicate) le alterazioni molecolari relative al NSCLC in relazione alla loro rilevanza scientifica quali biomarcatori. A queste sono correlati, in uno scenario terapeutico in costante aggiornamento: farmaci con indicazioni rimborsate, medicinali con modalità diverse di accesso, farmaci disponibili in trial clinici. In riferimento a questo schema, sono stati confrontati i costi tra metodiche standard e test NGS per la profilazione genomica del NSCLC in 1a linea di trattamento (riconducibile a uno scenario di pratica clinica, nel quale vengono valutate alterazioni raccomandate e consigliate).

I costi dell'attività diagnostica, rilevati per 774 pazienti in due ospedali italiani dallo studio Next, sono stati incrementati dei costi di struttura (overheads), secondo indicazioni riportate nella letteratura scientifica. Tale confronto ha evidenziato che la profilazione mediante NGS del NSCLC su biopsia tissutale (con pannello da 52 geni) determina un'importante riduzione della spesa per paziente testato, con un costo compreso overheads pari a € 1.146 per NGS rispetto a € 1.781 per standard. E' stato valutato anche il costo della profilazione estesa (Comprehensive Genomic Profiling-CGP) del NSCLC con tecnologia NGS, in uno scenario di pratica clinica in evoluzione che consente di testare/studiare contemporaneamente 300 alterazioni, alcune delle quali con implicazioni terapeutiche disponibili nei prossimi anni, e di fornire dati anche sul carico mutazionale del tumore-TMB, con un costo compreso overheads pari a € 1.863. La presente analisi ha permesso quindi di colmare un gap informativo sui costi della profilazione genomica nel nostro Paese, contribuendo a fornire indicazioni per la determinazione di tariffe relative al sequenziamento genico di nuova generazione.

1. PROFILAZIONE GENOMICA IN ONCOLOGIA: INTRODUZIONE

Le alterazioni molecolari svolgono un ruolo fondamentale nello sviluppo delle neoplasie e rappresentano possibili bersagli per interventi terapeutici. Esse richiedono strumenti diagnostici, come i test di profilazione genomica che forniscono informazioni ampie per tracciare il profilo genetico-molecolare delle varie forme tumorali, al fine di trattare i pazienti con terapie personalizzate.

Inizialmente la profilazione genomica era limitata all'individuazione di una singola alterazione rilevabile con un test, che si trasferiva poi in un'informazione in merito alla sensibilità/resistenza ad un singolo farmaco e per una specifica sede tumorale. Successivamente, si è passati alla determinazione di più mutazioni studiate insieme per una singola patologia neoplastica, spesso con metodiche differenti. Questo approccio ha permesso la stratificazione dei pazienti per l'impiego di combinazioni attive a più livelli di farmaci a bersaglio molecolare.

L'attuale fase è caratterizzata da importanti innovazioni tecnologiche, in particolare dall'introduzione della Comprehensive Genomic Profiling (CGP) mediante approcci di Next-Generation Sequencing (NGS), sia su biopsia tissutale che biopsia liquida (ovvero analisi del DNA libero circolante - cfDNA), quando il tessuto non è disponibile o inadeguato o il/la paziente ha comorbidità tali da escludere un approccio diagnostico invasivo. Queste nuove tecnologie possono analizzare simultaneamente centinaia di alterazioni, permettendo di ottenere un profilo genetico-molecolare complessivo della neoplasia nonché di monitorare la sua evoluzione nel tempo. Impiegando queste nuove tecniche, è possibile selezionare e targettizzare sempre più precisamente pazienti sensibili a una terapia mirata e valutarne l'evoluzione con l'individuazione (su tessuto e/o sangue) di cloni/subcloni tumorali resistenti e potenzialmente suscettibili di ulteriori terapie target, stimando anche biomarcatori complessi quali, ad esempio, il carico mutazionale del tumore (TMB - Tumor Mutational Burden).¹

L'evoluzione della medicina di precisione richiede la costituzione di Molecular Tumor Board (MTB), con attività omogenee sul territorio nazionale, che abbiano la finalità di stabilire i criteri di selezione dei pazienti oncologici, per i quali già non sussistano indicazioni definite a trattamenti target e/o a profilazione molecolare NGS. Pazienti da sottoporre quindi a profilazione estesa (CGP) con l'obiettivo di valutare il significato e le potenziali indicazioni cliniche derivate delle alterazioni geniche identificate, e conseguentemente intervenire sulla base della disponibilità di farmaci a target molecolare e delle conoscenze cliniche disponibili.²

In questo scenario di grande sviluppo della medicina di precisione, un **Gruppo di Lavoro multidisciplinare, anche attraverso il confronto con interlocutori pubblici e privati del nostro SSN, ha approntato un'analisi sugli aspetti clinici ed economici della profilazione genomica del NSCLC (non-small-cell lung cancer), tumore paradigmatico per la limitata disponibilità di campioni tissutali per l'esecuzione di diversi test di patologia molecolare predittiva.** Neoplasia nella quale le tecnologie NGS possono consentire la valutazione contemporanea di diverse alterazioni, individuandone alcune recentemente caratterizzate che non potrebbero essere rilevate con altri test.

La presente analisi è stata impostata in riferimento alle alterazioni da testare per questo tumore indicate dalle Linee Guida AIOM (Associazione Italiana di Oncologia Medica) per le neoplasie del polmone (ed. 2020)³ e dalle Raccomandazioni ESMO (European Society for Medical Oncology) per l'utilizzo del sequenziamento genico di nuova generazione-NGS (ed. 2020).⁴

Secondo questa prospettiva sono stati confrontati i costi tra metodiche standard e test NGS per la profilazione genomica del NSCLC in 1a linea di trattamento, rilevati in Ospedali italiani, con la finalità di colmare un gap informativo su questo tema nel nostro Paese e di fornire indicazioni per la determinazione di tariffe relative al sequenziamento genico di nuova generazione.

2. QUADRO EPIDEMIOLOGICO: NEOPLASIE DEL POLMONE

Il NSCLC rappresenta l'85-90% di tutti i tumori polmonari maligni:⁵ i suoi istotipi più frequenti sono l'adenocarcinoma (55% dei casi) e il carcinoma squamoso (34% dei casi), mentre gli altri istotipi, tra cui il carcinoma a grandi cellule o indifferenziato, costituiscono l'11% dei casi.⁶

Incidenza.⁷ In Italia si stimano, partendo dai dati di popolazione raccolti dai Registri Tumori Italiani, 377.000 nuovi casi di neoplasie maligne per l'anno 2020. Il tumore del polmone è la terza neoplasia più frequente nella popolazione (10,9% con circa 41.000 casi), seconda tra gli uomini (27.550 casi, 14,1%) e terza nelle donne (13.300 casi, 7,3%).

Per i maschi rappresenta il secondo tumore per frequenza dopo la prostata: 14% nella fascia 50-69 anni e 17% over 70. E' meno frequente tra le femmine, al quarto posto tra le 50-69enni (7%) e al terzo nelle donne oltre 70 anni (8%). Per entrambi i sessi non compare tra i primi 5 tumori più frequenti prima dei 50 anni. Gli andamenti nei tassi di incidenza del tumore polmonare, nel periodo 2008-2016, mostrano un trend in calo negli uomini (-1,7%), più evidente nella fascia 50-69 anni; mentre è in aumento tra le donne (+3,4%), soprattutto oltre 70 anni.

Mortalità.⁷ Le neoplasie del polmone rappresentano la prima causa di morte oncologica (18,8%) con circa 34.000 decessi su tutta la popolazione nel 2017: la prima causa tra gli uomini (23.400 decessi pari al 23,9%) e la seconda tra le donne (10.000 decessi pari al 12,5%).

Il tasso di mortalità 2020 stimato rispetto al 2015 risulta essere superiore del 5,2% tra le femmine e in diminuzione tra i maschi (-11,2%).

Sopravvivenza.⁷ La diagnosi di tumore del polmone si verifica spesso in stadio avanzato, e la sopravvivenza a 5 anni dalla diagnosi è pari al 16% su tutta la popolazione: 15% tra gli uomini e 19% tra le donne (periodo di incidenza 2005-2009).

Prevalenza.⁷ Nel nostro Paese nel 2020 si stimano 117.800 soggetti vivi con una pregressa diagnosi di tumore del polmone (77.200 uomini e 40.600 donne). La neoplasia si è sviluppata da meno di 2 anni nel 34% delle persone, da 2-5 anni nel 23%, da 5-10 nel 17%, da oltre 10 anni solo nel 25% dei soggetti vivi.

3. BIOMARCATORI E TECNICHE PER LA PROFILAZIONE GENOMICA DEL NSCLC

La profilazione genomica delle neoplasie del polmone costituisce un elemento fondamentale del percorso di diagnosi e cura del paziente, in riferimento alla possibilità di prescrivere trattamenti a bersaglio molecolare in popolazioni selezionate per la presenza o l'espressione di un determinato biomarcatore.

La presente analisi è stata impostata in riferimento alle alterazioni molecolari da testare per NSCLC, indicate dalle Linee Guida Polmone AIOM 2020³ e dalle Raccomandazioni NGS ESMO 2020.⁴

ESMO nel 2018 ha definito il framework ESCAT (Esmo Scale for Clinical Actionability of molecular Targets),⁸ che classifica le alterazioni molecolari in sei livelli (dal più alto al più basso) a seconda della loro rilevanza quali biomarcatori per individuare i pazienti da trattare con terapie mirate.

Il **livello I** è relativo a biomarcatori già utilizzabili nella pratica clinica di routine. In particolare: per il **livello I-A** è stato dimostrato in RCTs che l'abbinamento "Alterazione-Farmaco (A-F)" è associato a un miglioramento degli outcome; per il **livello I-B** sono stati evidenziati per "A-F" risultati clinicamente significativi con studi prospettici non randomizzati; per il **livello I-C** sono stati dimostrati benefici clinici associati ad "A-F", con studi comparativi o basket trials.

Il **livello II** corrisponde ad alterazioni ancora oggetto di studio, per le quali "A-F" in studi clinici prospettici è associata a un'attività antitumorale di cui, pur non conoscendone ancora l'entità, si riscontra un beneficio clinicamente significativo (**livello II-A**) oppure un incremento di risposta da parte dei pazienti trattati (**livello II-B**). Il **livello III** è relativo a biomarcatori per i quali si ipotizza che "A-F" migliori gli outcome. In particolare, per il **livello III-A** il beneficio clinico è stato dimostrato nei pazienti con l'alterazione specifica (come i livelli I e II) ma in un diverso tipo di tumore, con evidenze cliniche limitate/assenti per il carcinoma specifico. Il **livello III-B** corrisponde ad un'alterazione simile per la quale ci sono evidenze precliniche non supportate da dati clinici. Per il **livello IV** l'alterazione (oppure un'alterazione simile) è potenzialmente azionabile con farmaci in modelli preclinici in vitro o in vivo; mentre per il **livello V** la corrispondenza "A-F" è associata a evidenze che supportano un approccio di combinazione, ma senza un significativo vantaggio clinico. Infine, il **livello X** indica alterazioni per le quali, al momento, non vi sono evidenze cliniche.

Le alterazioni molecolari relative al NSCLC – in riferimento alle più recenti LG Polmone AIOM³ e Raccomandazioni NGS ESMO⁴ – sono state raggruppate (in raccomandate, consigliate e indicate) in relazione alla loro rilevanza scientifica quali biomarcatori, alle quali corrispondono, in uno scenario terapeutico in costante aggiornamento, farmaci con indicazioni rimborsate, medicinali con modalità diverse di accesso, farmaci disponibili in trial clinici, come descritto di seguito e riportato in tabella 1.

Biomarcatori raccomandati e terapie con indicazioni rimborsate

Le Linee Guida Polmone AIOM 2020³ e le Raccomandazioni NGS ESMO 2020⁴, in pazienti con NSCLC in stadio IIIB-IIIC (non candidati a trattamenti loco-regionali) e in stadio IV – al fine di consentire la selezione dei pazienti per terapie a bersaglio molecolare per farmaci con indicazioni rimborsate da AIFA – raccomandano la valutazione dei seguenti biomarcatori:

- mutazioni di **EGFR** (Epidermal Growth Factor Receptor) (**ESCAT ESMO I-A**)
- riarrangiamenti di **ALK** (Anaplastic Lymphoma Kinase) (**ESCAT ESMO I-A**)
- traslocazioni a carico di **ROS1** (Proto-oncogene tyrosine-protein kinase) (**ESCAT ESMO I-B**)
- mutazioni di **BRAF** (B-Raf proto-oncogene) (**ESCAT ESMO I-B**)
- espressione di **PD-L1** (Programmed Death-Ligand 1)

Mutazioni di EGFR. Sono state identificate mutazioni attivanti a carico degli esoni 18, 19, 20 e 21 di EGFR soprattutto nei pazienti con NSCLC ad istotipo adenocarcinoma (prevalenza: 10-15% LG AIOM; 15% ESMO). Il 90% di tali mutazioni (definite mutazioni comuni o "classiche") è costituito dalle delezioni dell'esone 19 (Ex19dels) e dalla mutazione puntiforme L858R dell'esone 21. Il restante 10% (definite mutazioni non comuni o rare) è rappresentato da un gruppo eterogeneo di alterazioni molecolari, tra le quali le più note sono: per esone 18 (mutazioni G719C, G719S, G719A, V689M, N700D, E709K/Q, S720P); per esone 20 (mutazioni V765A, S768I, V769L, T783A e T790M, inserzioni); per esone 21 (mutazioni N826S, A839T, K846R, L861Q, G863D).

Come indicato dalle LG AIOM, possono essere sottoposti ad analisi mutazionali di EGFR pazienti con NSCLC ad istotipo ADC (adenocarcinoma), CGC (carcinoma a grandi cellule), NSCLC misto con ADC e NSCLC N.A.S (scarsamente differenziato o non-altrimenti specificato) che presentano la più alta probabilità di riscontro di mutazioni.

Riarrangiamenti di ALK. Si ritrovano maggiormente in soggetti giovani con NSCLC ad istotipo ADC, con assente o ridotta abitudine tabagica (prevalenza: 3-7% LG AIOM; 5% ESMO). *Come indicato dalle LG AIOM, l'analisi di ALK trova indicazione nei pazienti con NSCLC ad istotipo ADC, CGC, NSCLC misto con ADC e NSCLC N.A.S, che presentano la più alta probabilità di riscontro di riarrangiamenti del gene.*

BIOMARCATORI PER LA PROFILAZIONE GENOMICA DEL NSCLC

BIOMARCATORI/ ALTERAZIONI DA VALUTARE	ESCAT ESMO ⁸	CLASSIFICAZIONE ALTERAZIONI MOLECOLARI A SECONDA DELLA LORO RILEVANZA COME BIOMARCATORI E TERAPIE CORRELATE
---	----------------------------	---

EGFR	I-A
ALK	I-A
ROS1	I-B
BRAF	I-B
PD-L1	

**Biomarcatori RACCOMANDATI per NSCLC secondo
LG POLMONE AIOM 2020³ e Raccomandazioni NGS ESMO 2020⁴
e TERAPIE con INDICAZIONI RIMBORSATE**

MET exon 14 skip	I-B
KRAS	II-B
RET	I-C
NTRK	I-C
ERBB2 Mutazioni	II-B

**Biomarcatori CONSIGLIATI per NSCLC secondo
LG POLMONE AIOM 2020³ e Raccomandazioni NGS ESMO 2020⁴
e TERAPIE con MODALITÀ DIVERSE DI ACCESSO:
"uso compassionevole" D.M. 7 settembre 2017
(modalità uso terapeutico di medicinale sottoposto a
sperimentazione clinica oppure uso terapeutico nominale)**

MET Amplificazioni
ERBB2 Amplificazioni
ERBB2 Espressione
FGFR 1-2-3
ALTRE ALTERAZIONI

**Biomarcatori INDICATI per NSCLC secondo
LG POLMONE AIOM 2020³ e Raccomandazioni NGS ESMO 2020⁴
(MET Amplificazioni, ERBB2 Amplificazioni, ERBB2 Espressione, FGFR1-2-3
+ ALTRE alterazioni quali PIK3CA, PTEN, DDR2, PDGFR, BRCA 1/2, NRG1)
e TERAPIE con FARMACI DISPONIBILI IN TRIALS CLINICI**

ULTERIORI ALTERAZIONI

Ulteriori alterazioni per le quali sono in corso Trials Clinici
(ERBB4, AKT1, STK11, NRAS NOTCH1, SMAD4, FBXW7, MAP2K1, CTNNB1, TP53)
+ **20 mutazioni** molecolari attualmente non rilevanti
ai fini di un'indicazione terapeutica specifica

MSI

MSI (instabilità dei microsatelliti)
biomarcatore per trattamento con immunoterapici

HRD

HRD (deficienze ricombinazione omologa)
comprende diverse alterazioni genetiche
(tra le quali BRCA1/2, ATM, PALB2, RAD51, CHEK1/2)

TMB

TMB (Tumor Mutational Burden) carico mutazionale del tumore,
che permette di ottenere un profilo molecolare complessivo della neoplasia
e di identificare pazienti che potrebbero rispondere all'immunoterapia

Riarrangiamenti di ROS1. Si tratta di un recettore tirosino-chinasico con una struttura molto simile al biomarcatore ALK, con il quale condivide il target dei pazienti NSCLC: maggiormente soggetti giovani, con scarsa/assente abitudine tabagica, con istotipo ADC (prevalenza: 1-2% LG AIOM ed ESMO).

La valutazione di ROS1 è indicata, secondo le LG AIOM, nei pazienti con NSCLC ad istotipo ADC, CGC, NSCLC misto con ADC e NSCLC N.A.S., che presentano la più alta probabilità di riscontro di riarrangiamenti del gene.

Mutazioni di BRAF. Le mutazioni della serina/treonina kinasi BRAF sono presenti nei pazienti NSCLC ad istotipo ADC (prevalenza: 3-5% LG AIOM; 2% ESMO). Metà delle mutazioni puntiformi di BRAF si localizzano a livello del codone aminoacidico V600 dell'esone 15 (in particolare V600E), le restanti in ulteriori codoni degli esoni 11 e 15. A differenza delle altre alterazioni, le mutazioni di BRAF non interessano espressamente pazienti che non abbiano mai fumato o con una scarsa esposizione tabagica. *Come indicato dalle LG AIOM, possono essere sottoposti ad analisi mutazionale di BRAF i pazienti con NSCLC ad istotipo ADC, CGC, NSCLC misto con ADC e NSCLC N.A.S., i quali presentano la più alta probabilità di riscontro di mutazioni; nei casi di carcinoma squamoso diagnosticato su piccole biopsie tissutali o su campioni citologici, si consiglia comunque di eseguire il test, in quanto non è possibile escludere la presenza di una componente mista (adeno/squamoso).*

Espressione di PD-L1. E' il biomarcatore predittivo per la selezione dei pazienti eleggibili con NSCLC avanzato a un trattamento immunoterapico di 1a linea con singolo agente.

In particolare, possono accedere a tale trattamento soltanto quei pazienti il cui campione tissutale, sia istologico che citologico, fissato in formalina, incluso in paraffina, e testato con cloni anticorpali validati, mostri una positività di espressione per PD-L1 in un numero uguale o maggiore al 50% delle cellule neoplastiche valutate secondo Tumor Proportional Score (TPS), su almeno 100 cellule neoplastiche.

Per l'eleggibilità alla 2a linea di trattamento con immunoterapico il livello di espressione di PD-L1 deve invece essere maggiore o uguale all'1%. Circa il 67% dei pazienti con NSCLC sono attesi avere un TPS per PD-L1 $\geq 1\%$, mentre un TPS $\geq 50\%$ è stato riscontrato in circa il 28% dei casi.⁹

Biomarcatori consigliati e terapie con modalità diverse di accesso

Le Linee Guida Polmone AIOM 2020³ e le Raccomandazioni NGS ESMO 2020⁴ consigliano la valutazione di altre alterazioni (I-B, II-B e I-C ESCAT ESMO), per le quali non vi sono ancora farmaci approvati in pratica clinica nel nostro Paese, ma esistono modalità diverse di accesso: "uso compassionevole" D.M. 7 settembre 2017 (modalità uso terapeutico di medicinale sottoposto a sperimentazione clinica oppure uso terapeutico nominale).

I biomarcatori, la cui valutazione è consigliata sono:

- mutazioni che causano una maturazione aberrante del trascritto (exon skipping) a livello dell'esone 14 di MET (tyrosine-protein kinase Met): **MET exon 14 skip** (ESCAT ESMO I-B, prevalenza 3%)
- mutazione G12C dell'esone 2 del gene **KRAS** (Kirsten RAt Sarcoma oncogene homolog) (ESCAT ESMO II-B, prevalenza 12%)
- riarrangiamenti del gene **RET** (REarranged during Transfection gene) (ESCAT ESMO I-C, prevalenza 1-2%)
- riarrangiamenti dei geni **NTRK** (Neurotrophic Tyrosine Receptor Kinase) (ESCAT ESMO I-C, prevalenza 0,23-3%)
- mutazioni attivanti a carico della regione del gene **ERBB2** (Erb-b2 receptor tyrosine kinase 2 gene) che codifica per il dominio tirosino-chinasico della relativa proteina (ESCAT ESMO II-B, prevalenza 2-5%).

Biomarcatori indicati e terapie con farmaci disponibili in trials clinici

Le Linee Guida Polmone AIOM 2020³ e le Raccomandazioni NGS ESMO 2020⁴ hanno individuato ulteriori alterazioni molecolari con lo scopo di favorire l'accesso dei pazienti ai trattamenti a bersaglio molecolare disponibili nell'ambito di sperimentazioni cliniche in corso anche in Italia.

Tra queste, le LG AIOM segnalano:

- mutazioni a carico del gene **PIK3CA** (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha) (**ESCAT ESMO III-A**, prevalenza 1,2-7%)
- amplificazione di **FGFR1** (fibroblast growth factor receptor 1)
- mutazioni a carico del gene **PTEN** (phosphatase and tensin homolog)
- amplificazione e mutazione di **PDGFR** (platelet derived growth factor receptor)
- mutazioni di **DDR2** (discoidin domain receptor tyrosine kinase 2)

Le Raccomandazioni ESMO indicano:

- amplificazioni di **ERBB2** (Erb-b2 receptor tyrosine kinase 2 gene) (**ESCAT ESMO II-B**, prevalenza 2-5%)
- mutazioni di **BRCA 1/2** (Breast Cancer Type 1/2 susceptibility protein) (**ESCAT ESMO III-A**, prevalenza 1,2%)
- fusioni di **NRG1** (neuregulin-1 gene) (**ESCAT ESMO III-B**, prevalenza 1,7%)

Altre alterazioni da valutare sono le **amplificazioni di MET** (**ESCAT ESMO II-B**, prevalenza 3%), implicate nella resistenza acquisita agli inibitori di EGFR, e l'**espressione di ERBB2**, la cui iper-espressione nel NSCLC è spesso associata a una malattia aggressiva con una prognosi sfavorevole e a una ridotta sopravvivenza globale.

In tabella 1, in riferimento alla profilazione estesa del NSCLC con tecnologia NGS (mediante pannello che consente di testare/studiare contemporaneamente 300 alterazioni, alcune delle quali con implicazioni terapeutiche disponibili nei prossimi anni), sono state inserite:

- Ulteriori alterazioni per le quali sono in corso Trials Clinici (ERBB4, AKT1, STK11, NRAS, NOTCH1, SMAD4, FBXW7, MAP2K1, CTNNB1, TP53) + 20 mutazioni molecolari attualmente non rilevanti ai fini di un'indicazione terapeutica specifica.
- MSI (instabilità dei microsatelliti), biomcatore per trattamento con immunoterapici.
- HRD (deficienze ricombinazione omologa) comprende diverse alterazioni genetiche (tra le quali, BRCA 1/2, ATM, PALB2, RAD51, CHEK1/2).
- TMB (Tumor Mutational Burden), carico mutazionale del tumore che permette di ottenere un profilo molecolare complessivo della neoplasia e di identificare pazienti che potrebbero rispondere all'immunoterapia.

CARATTERISTICHE METODICHE STANDARD

Le tecniche standard si distinguono in metodiche *in situ* (che si esplicano direttamente su sezioni di tessuto tumorale con valutazione dei preparati al microscopio) e metodiche *non in situ* (che richiedono l'estrazione del DNA dal campione tumorale). Le principali *in situ* sono: **IHC** (Immunoistochimica), **IF** (immunofluorescenza) e **ISH** (ibridazione *in situ*). Quest'ultima utilizza sonde altamente specifiche che ibridano con regioni di DNA target ad esse complementari, presenti nel campione da esaminare: quando sono marcate con fluorofori si parla di **FISH** (Fluorescent In Situ Hybridization). Tra le tecniche standard *non in situ* (che analizzano un solo marcatore per volta) rientrano: **Sequenziamento Sanger**, **Pirosequenziamento**, **Real Time PCR (RT-PCR)**, **droplet digital PCR (ddPCR)**.

L'IHC predittiva nel NSCLC, oltre alla valutazione dell'espressione di PD-L1 e dell'espressione di ERBB2, trova applicazione in questo tumore soprattutto per l'identificazione di fusioni geniche, con particolare riguardo ad ALK e ROS1. Essa può essere realizzata mediante companion diagnostic (sviluppati in parallelo con i farmaci target, testati in trial clinici e approvati in genere dalla FDA insieme al medicinale) o test sviluppati in laboratorio.

La positività IHC si valuta mediante uno *scoring system*, basato su: (i) percentuale di cellule neoplastiche; (ii) intensità di reazione (debole, moderata, forte); (iii) localizzazione dell'espressione sulle membrane citoplasmatiche (completa o incompleta di membrana). In alcuni casi (espressione moderata e non completa di membrana), la positività immunoistochimica non è sufficiente per definire l'eleggibilità del paziente al trattamento ed è necessaria la conferma con metodica di secondo livello, quale ad esempio **FISH**.

La **FISH in ambito predittivo**, per l'elevata sensibilità e specificità, riesce a evidenziare e identificare anche riarrangiamenti genici con partner di fusione noti e non noti; presenta però alti costi e richiede la formazione di personale esperto.

Il **Sequenziamento Sanger** per molti anni è stato considerato il gold standard per l'identificazione di mutazioni geniche note e non note su campioni tumorali grazie all'elevata specificità e ai bassi costi per l'individuazione di un basso numero di target. Tuttavia, numerosi svantaggi hanno portato al superamento di questa metodologia in quanto: (i) poco sensibile, individua alterazioni quando le copie di DNA mutato rappresentano il 20% circa del totale; (ii) poco processiva, occorre molto tempo per sequenziare lunghi tratti di DNA e possono essere esaminati un solo gene o tratto genico e un solo campione per volta.

Il **Pirosequenziamento** permette di effettuare le determinazioni su campioni in parallelo, consentendo un'analisi comparativa di DNA di origine diversa e di rilevare con facilità alterazioni di singole basi. Inoltre, rispetto al sequenziamento standard, ha una maggior sensibilità (tra 5-10% rispetto al 20%) e la possibilità di sequenziare frammenti piuttosto corti di DNA.

La **RT-PCR** individua alterazioni (con differenze tra le varie mutazioni identificate) quando le copie di DNA mutato rappresentano l'1% del DNA totale (sensibilità teorica), ma sono necessarie 5-10 copie di DNA mutato. Infatti l'analisi effettuata su un numero esiguo di cellule potrebbe risultare in un falso negativo. Kit basati su metodiche RT-PCR permettono l'individuazione di alterazioni con elevata sensibilità teorica (0,1%-5%), adeguati controlli positivi/negativi di reazione e procedure standardizzate. Tra questi kit si segnala IDYLLA (utilizzato in un ospedale dell'analisi riportata nella tabella 2), test rapido e completamente automatizzato che permette l'identificazione delle principali varianti mutazionali di EGFR, KRAS e BRAF.

La **ddPCR** si basa sul principio della PCR in emulsione e ha il vantaggio di una notevole sensibilità, essendo in grado di individuare mutazioni a frequenza allelica anche <0.1%. Questa metodica trova applicazione principalmente per lo studio della biopsia liquida piuttosto che per l'analisi di campioni tissutali.

La **SPETTROMETRIA DI MASSA** (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight, MALDI-TOF) è una tecnologia multimarker per l'analisi di alterazioni hot-spot. In particolare permette la genotipizzazione del campione mediante l'amplificazione del DNA e una reazione di estensione a singola base di primer adiacenti ai siti polimorfici di interesse. La sensibilità analitica del metodo può variare dal 2,5 al 10% in base alla mutazione testata. Sono state sviluppate piattaforme di sequenziamento (tra le quali SEQUENOM, utilizzato in un ospedale dell'analisi riportata nella tabella 2), basate sulla spettrometria di massa MALDI-TOF, che permettono di analizzare con un unico test le alterazioni relative ai geni EGFR, BRAF, KRAS e mutazioni e amplificazioni di ERBB2.

BIOMARCATORI e METODICHE STANDARD

- Per la valutazione del biomarcatore **EGFR** le tecniche standard maggiormente utilizzate sono **Sanger** e **RT-PCR** sui tessuti tumorali. In casi selezionati, si ricorre alla **Biopsia liquida** (quando la quantità e/o qualità del tessuto disponibile non siano sufficienti per effettuare le analisi molecolari previste).
- Inizialmente l'indagine diagnostica di riferimento per **ALK** era la **FISH**, ma negli ultimi anni le evidenze a supporto dell'impiego di **IHC** sono notevolmente aumentate. Per il test FISH è previsto un cut-off del 15% di cellule neoplastiche riarrangiate per esprimere la positività. In IHC è possibile utilizzare diversi anticorpi anti-ALK, alcuni dei quali prevedono un risultato dicotomico di tipo positivo/negativo, mentre altri kit prevedono uno score. Lo score 0 identifica un tumore negativo per ALK, lo score 3+ coincide con la positività per ALK, mentre è prevista **l'ulteriore conferma con test FISH** (o altra metodica) in caso di positività indeterminata con score 1+ e 2+.
- Per **ROS1**, la tecnica **IHC** viene utilizzata da alcuni centri ma è ritenuta meno affidabile della **FISH** che viene quindi preferita in altre realtà e comunque sempre utilizzata a conferma dei dati di **IHC**.
- Per le mutazioni di **BRAF** è indicata la tecnica **Sanger** oppure **RT-PCR**.

- Sia l'**espressione di PD-L1** che l'**espressione di ERBB2** vengono generalmente testate con **IHC** e non possono essere valutate con i test NGS.
- Per le **altre alterazioni relative a ERBB2 (valutabili anche con NGS)** possono essere impiegate **Sanger** o **RT-PCR** per **mutazioni di ERBB2**; le metodiche **IHC** o **FISH** per **amplificazioni di ERBB2**.
- Per il gene **MET**: vengono indicate **RT-PCR** e **Sanger** per **mutazioni MET exon 14 skip**; **IHC** o **FISH** per **MET amplificazioni**.
- Per i riarrangiamenti dei geni **RET** viene utilizzata la metodica **FISH**; mentre quelli relativi a **NTRK** possono essere valutati con **IHC**, ma necessitano sempre la conferma con **FISH**.
- Il **Sequenziamento Sanger** è indicato per le alterazioni del gene **KRAS**, in alternativa a **RT-PCR**.

Per la profilazione genomica del NSCLC in 1a linea di trattamento, a titolo esemplificativo vengono riportate in tabella 2 le metodiche standard utilizzate in 4 Ospedali in Italia per la valutazione delle alterazioni raccomandate e consigliate secondo le più recenti LG Polmone AIOM³ e Raccomandazioni NGS ESMO⁴ (dati studio Next, relativi a 1.455 pazienti).¹⁰⁻¹¹

PROFILAZIONE GENOMICA DEL NSCLC IN 1A LINEA DI TRATTAMENTO: BIOMARCATORI E METODICHE STANDARD UTILIZZATE IN 4 OSPEDALI IN ITALIA

BIOMARCATORI/ ALTERAZIONI DA VALUTARE	ESCAT ESMO ⁸	OSPEDALE A	OSPEDALE B	OSPEDALE C	OSPEDALE D
		364 Pazienti	317 Pazienti	288 Pazienti	486 Pazienti
EGFR	I-A	SANGER 90% RT-PCR 6% IDYLLA 4%	RT-PCR 100%	RT-PCR 100%	SPETTROMETRIA 80% SANGER 10% RT-PCR 10%
ALK	I-A	IHC 100%	IHC 100%	FISH 100%	IHC 96% FISH 4%
ROS1	I-B	FISH 100%	IHC 100%	FISH 100%	IHC 96% FISH 4%
BRAF	I-B	SANGER 90% RT-PCR 5% IDYLLA 5%	RT-PCR 100%	SANGER 50% RT-PCR 50%	SPETTROMETRIA 80% RT-PCR 20%
PD-L1		IHC 100%	IHC 100%	IHC 100%	IHC 100%
MET exon 14 skip	I-B	SANGER 100%	SANGER 100%	RT-PCR 100%	SANGER 100%
KRAS	II-B	SANGER 96% RT-PCR 2% IDYLLA 2%		SANGER 100%	SPETTROMETRIA 80% SANGER 10% RT-PCR 10%
RET	I-C	FISH 100%	FISH 100%	FISH 100%	FISH 100%
NTRK	I-C			IHC 50% FISH 50%	IHC 100%
ERBB2 Mutazioni	IIB			SANGER 100%	SPETTROMETRIA 90% SANGER 10%

**Biomarcatori RACCOMANDATI per NSCLC secondo LG POLMONE AIOM 2020³ e Raccomandazioni NGS ESMO 2020⁴
e TERAPIE con INDICAZIONI RIMBORSATE**

**Biomarcatori CONSIGLIATI per NSCLC secondo LG POLMONE AIOM 2020³ e Raccomandazioni NGS ESMO 2020⁴
e TERAPIE con MODALITÀ DIVERSE DI ACCESSO: "uso compassionevole" D.M. 7 settembre 2017
(modalità uso terapeutico di medicinale sottoposto a sperimentazione clinica oppure uso terapeutico nominale)**

SEQUENZIAMENTO GENICO DI NUOVA GENERAZIONE (NGS)

- L'incremento di target molecolari e di farmaci a bersaglio disponibili per il NSCLC richiede l'analisi di un numero sempre maggiore di biomarcatori, avendo spesso a disposizione quantità estremamente limitate di tessuto neoplastico per l'esecuzione dei test.
- Le nuove acquisizioni sulle alterazioni geniche che conferiscono resistenza al tumore dopo la terapia target determinano, inoltre, la necessità di valutare l'assetto molecolare completo del campione tumorale in esame, sia primitivo sia metastatico, includendo le mutazioni, la variazione del numero di copie e la presenza di fusioni geniche.
- **Il sequenziamento genico di nuova generazione (NGS)** consente il sequenziamento in contemporanea di regioni specifiche del genoma (Targeted Sequencing, TS), di regioni geniche codificanti (Whole Exome Sequencing) fino all'intero genoma (Whole Genome Sequencing).
- **Il sequenziamento TS**, quello con maggior impiego nella pratica clinica, consta di pannelli genici comprendenti i principali oncogeni e anti-oncogeni actionable o con un ruolo predittivo e/o prognostico.
- **Le tecnologie NGS sono in grado di fornire informazioni utili** anche sui meccanismi di resistenza.
- **I pannelli NGS possono coprire tutte le alterazioni molecolari** per le quali esiste una indicazione clinica e quindi mutazioni puntiformi, inserzioni/delezioni, variazioni del numero di copie geniche e riarrangiamenti strutturali, quali fusioni, ove richiesto. Per le fusioni, il sequenziamento del RNA garantisce una migliore affidabilità diagnostica. Sia l'espressione di PD-L1 che l'espressione di ERBB2 non possono essere valutate con i test NGS.
- **Il Tumor Mutational Burden (TMB)**, carico mutazionale del tumore che permette di ottenere un profilo molecolare complessivo della neoplasia può essere calcolato utilizzando pannelli genici di grandi dimensioni (centinaia di geni), che differiscono per il numero di geni valutabili, il tipo di alterazioni evidenziabili, il tipo e la quantità di campioni che possono essere analizzati e i tempi di esecuzione.
- **I Test NGS** nella diagnostica molecolare si caratterizzano per: (i) elevata sensibilità e specificità; (ii) possibilità di testare contemporaneamente più pazienti e diversi geni; (iii) abbattimento dei costi in virtù della maggiore scalabilità della tecnologia. Richiedono però personale specificamente formato con competenze bioinformatiche per l'analisi dei dati.

Le Linee Guida Polmone AIOM³ indicano che l'impiego del sequenziamento genico di nuova generazione, per quanto riguarda la valutazione dei biomarcatori molecolari approvati per la pratica clinica per i pazienti affetti da NSCLC, è consigliabile rispetto alle tecnologie convenzionali data la limitata disponibilità di campioni tissutali per l'esecuzione di diversi test di patologia molecolare predittiva e la possibilità di analizzare simultaneamente sia le alterazioni a carico di EGFR e BRAF, che le traslocazioni a carico di ALK e di ROS1. Si precisa, però, che il sequenziamento genico di nuova generazione, data la complessità insita della tecnica, deve essere implementato in centri preparati alla gestione del campione, senza sacrificare l'analisi di altri marcatori predittivi di risposta terapeutica, che vanno invece valutati in IHC, come ad esempio il PD-L1. Inoltre, l'impiego di ampi pannelli in NGS, che analizzano simultaneamente un elevato numero di geni (in aggiunta a EGFR, ALK, ROS1, BRAF) è da ritenersi una procedura da valutare esclusivamente nell'ambito di studi clinici e in centri ad elevata specializzazione e non come approccio up-front in pratica clinica.

Le Raccomandazioni NGS ESMO⁴, in relazione alle evidenze cliniche attuali, raccomandano l'uso di routine del sequenziamento genico di nuova generazione nel NSCLC (adenocarcinoma), nel colangiocarcinoma, nei tumori della prostata e dell'ovaio per l'identificazione delle alterazioni genomiche di Livello I (ESCAT ESMO), ovvero quelle con sufficienti informazioni a supporto per l'implementazione clinica.

4. LA PROFILAZIONE GENOMICA DEL NSCLC: CONFRONTO COSTI TRA METODICHE STANDARD E TEST NGS

La presente analisi relativa a NSCLC – come precedentemente indicato – è stata impostata dal punto di vista clinico, in relazione alle alterazioni genomiche da testare per questo tumore, secondo le Linee Guida Polmone AIOM 2020³ e le Raccomandazioni NGS ESMO 2020⁴, al fine di consentire la selezione dei pazienti da trattare con terapie a bersaglio molecolare.

Tali alterazioni (come riportato in tabella 1) sono state raggruppate in riferimento alla rilevanza delle evidenze scientifiche quali biomarcatori, in alterazioni: (i) raccomandate; (ii) consigliate; (iii) indicate. A queste corrispondono, per quanto riguarda le terapie correlate: (i) farmaci con indicazioni rimborsate da AIFA; (ii) medicinali con modalità diverse di accesso (“uso compassionevole” D.M. 7 settembre 2017, nelle modalità uso terapeutico di medicinale sottoposto a sperimentazione clinica oppure uso terapeutico nominale); (iii) farmaci disponibili in trial clinici.

Secondo questa prospettiva sono stati messi a confronto i costi delle metodiche standard (STD) e dei test NGS per la profilazione genomica del NSCLC , con un approccio integrato, ovvero: (i) STANDARD è il percorso di testing in cui si usano i test STD e, solo nel caso in cui sia necessario, si ricorre a NGS; (ii) NGS è il percorso di testing in cui la priorità viene data a NGS e, solo nel caso in cui questa tecnologia non sia utilizzabile, si ricorre a quelle STD. Il confronto dei costi tra tecniche diverse è stato possibile utilizzando i dati dello studio Next,¹⁰⁻¹¹ che ha misurato per l'Italia l'impatto economico di NGS (vs. metodiche standard) per la profilazione genomica del NSCLC e del tumore del colon-retto metastatico non reseccabile, colmando un gap informativo su questo tema nel nostro Paese.

CONFRONTO COSTI: BACKGROUND E METODO

In due recenti paper è stata condotta una revisione sistematica di letteratura degli studi che confrontano approcci NGS e STD¹²⁻¹³. Alcuni studi hanno confrontato l'intero processo diagnostico con un costo NGS per paziente che varia da \$ 1.512 a \$ 11.401, altri il solo sequenziamento genico con un costo per test compreso tra \$ 555 e \$ 5.196 per WES (Whole Exome Sequencing) e da \$ 1.906 a \$ 24.810 per WGS (Whole Genomic Sequencing).

Tali revisioni, che non includono alcuna evidenza sull'Italia, mostrano che gli studi sono condotti in prevalenza tramite approcci gross-costing e con raccolta retrospettiva dei dati, con un alto rischio di incompletezza delle informazioni. Inoltre il confronto viene effettuato tra STD e NGS, nell'ipotesi implicita che NGS sostituisca integralmente STD, non considerando gli effetti prospettici di ampiezza delle mutazioni geniche investigate. L'obiettivo dello studio Next è stato quello di superare, almeno parzialmente, tali limiti metodologici (pur mantenendo un approccio retrospettivo) e fornire la prima evidenza per l'Italia sui costi di NGS in confronto con approccio STD.

Lo studio Next per NSCLC ha analizzato diversi scenari in 4 realtà ospedaliere (dati relativi a 1.455 pazienti): (i) Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori (INT, Milano), (ii) AOU Sant'Andrea (Roma), (iii) Istituto Nazionale Tumori IRCCS "Fondazione Pascale" (Napoli); (iv) IRCCS IRST - Istituto Romagnolo per lo Studio dei Tumori "Dino Amadori" di Meldola (Forlì-Cesena). In riferimento alla costante evoluzione della profilazione genica con sequenziamento di nuova generazione, sono stati scelti per il presente confronto i dati dei due ospedali analizzati nel 2020, per complessivi 774 pazienti.

Per la profilazione genomica del NSCLC in 1a linea di trattamento – riconducibile a uno scenario di pratica clinica che prevede la valutazione delle alterazioni “raccomandate” e “consigliate” dalle più recenti LG Polmone AIOM³ e Raccomandazioni NGS ESMO⁴ (tabella 1), scenario sovrapponibile al “CP-Clinical Practice” dello studio Next – sono stati confrontati i costi delle metodiche STD vs test NGS (con pannello da 52 geni più pannello fusioni).

E' stato valutato anche il costo della profilazione estesa (Comprehensive Genomic Profiling-CGP) del NSCLC con tecnologia NGS – riconducibile a uno scenario di pratica clinica in evoluzione con un'estensione dei test fino all'analisi del TMB (Tumor Mutational Burden) carico mutazionale del tumore, (scenario, che valuta tutte le alterazioni riportate in tabella 1, sovrapponibile al "Future CP" dello studio Next) – utilizzando un pannello da 300 geni.

I dati di costo per la profilazione genomica del NSCLC – come già indicato – sono stati rilevati dallo studio Next, che in particolare:

1. Per ogni alterazione molecolare testata ha valutato i costi del test principale e quelli per eventuali test di conferma e/o fallimento.
2. Per ogni mutazione analizzata ha stimato i costi specifici per eseguire i test: (i) i costi del Personale (a partire dalla Retribuzione Annuale) per il tempo dedicato; (ii) i materiali di consumo utilizzati; (iii) l'acquisto e manutenzione dei macchinari necessari.
3. Per il percorso di testing NGS (eseguito su biopsia tissutale) ha considerato, oltre ai costi strettamente correlati ai test NGS, quelli relativi all'espressione di PD-L1 e di ERBB2 (nel caso di profilazione estesa) analizzate con metodiche STD, in quanto non valutabili mediante sequenziamento genico di nuova generazione.
4. Al fine di fornire indicazioni per la determinazione di una tariffa, ha incluso anche i costi di struttura (overheads) a integrazione di quelli direttamente attribuibili all'attività diagnostica. Si è fatto riferimento alla letteratura scientifica disponibile (Schwarze et al. 2020)¹⁴ che prevede l'incremento del 20% dei costi specifici per eseguire i test (punto 2), non essendo disponibili dati specifici dei centri e non essendovi un dato italiano validato, a causa, tra gli altri aspetti, della variabilità dei sistemi di contabilità analitica.
5. Ha raccolto tutti i dati di input tramite interviste basate su questionario strutturato, somministrato a oncologi, anatomopatologi, biologi e/o biologi molecolari, tecnici di laboratorio.

Lo studio Next presenta alcuni limiti. Il primo è rappresentato dal numero esiguo di centri interessati, anche se il numero di pazienti coinvolti è importante. Il secondo e principale limite è quello di aver raccolto i dati per tramite di questionario e non attraverso un'analisi empirica diretta sulle realtà aziendali, il che implica la possibilità di avere raccolto dati in parte di natura percettiva, in parte effettivamente rilevati dalle aziende sanitarie nel passato. I tempi della ricerca non hanno permesso una rilevazione campionaria, ad esempio del tempo dedicato dal personale: una valutazione "time-motion", ovvero una rilevazione diretta del tempo dedicato alle diverse attività, avrebbe necessitato di più rilevazioni a intervalli regolari per evitare bias di selezione. I ricercatori hanno comunque effettuato un controllo incrociato sulle aziende ai fini della verifica delle discrepanze più importanti.

Nonostante i limiti, si tratta della prima analisi empirica effettuata in Italia sui costi dei test NGS a partire dalle valutazioni critiche sulle precedenti evidenze di letteratura, con un importante numero di pazienti coinvolti, e confrontando scenari alternativi concretamente applicabili, attraverso un approccio di micro-costing.

CONFRONTO COSTI: RISULTATI

Dal confronto dei costi tra metodiche standard e test NGS per la profilazione genomica del NSCLC (tabella 3), inclusiva della valutazione dell'espressione di PD-L1 con immunistoichimica (tecnica STD) nel percorso di testing NGS, si evidenzia che **la profilazione genomica del NSCLC in 1a linea di trattamento mediante NGS (con pannello 52 geni più pannello fusioni) genera un'importante riduzione dei costi per paziente testato: con un costo medio compreso overheads pari a € 1.146 per NGS rispetto a € 1.781 per STD.**

**PROFILAZIONE GENOMICA DEL NSCLC (in 1A LINEA DI TRATTAMENTO ed ESTESA-CGP):
CONFRONTO COSTI TRA METODICHE STANDARD E TEST NGS**

BIOMARCATORI/ ALTERAZIONI DA VALUTARE	ESCAT ESMO ⁸	OSP 1		OSP 2	
		288 Pz	486 Pz	288 Pz	486 Pz
		Profilazione genomica NSCLC 1a linea trattamento STANDARD			
EGFR	I-A	✓	✓	✓	✓
ALK	I-A	✓	✓	✓	✓
ROS1	I-B	✓	✓	✓	✓
BRAF	I-B	✓	✓	✓	✓
PD-L1 (1)		IHC 100%	IHC 100%	IHC 100%	IHC 100%
MET exon 14 skip	I-B	✓	✓	✓	✓
KRAS	II-B	✓	✓	✓	✓
RET	I-C	✓	✓	✓	✓
NTRK	I-C	✓	✓	✓	✓
ERBB2 Mutazioni	II-B	✓	✓	✓	✓
MET Amplificazioni		✓	✓	✓	✓
ERBB2 Amplificazioni		---	---	---	---
ERBB2 Espressione (1)		IHC (solo Trials)	---	IHC (solo Trials)	---
FGFR 1-2-3		✓	---	✓	---
ALTRE MUTAZIONI		✓	---	✓	---
ULTERIORI MUTAZIONI		✓	---	✓	---
MSI		---	---	---	---
HRD		---	---	---	---
TMB		---	---	---	---

		OSP 1		OSP 2	
		288 Pz	486 Pz	288 Pz	486 Pz
		Profilazione genomica NSCLC 1a linea trattamento NGS			
EGFR	I-A	✓	✓	✓	✓
ALK	I-A	✓	✓	✓	✓
ROS1	I-B	✓	✓	✓	✓
BRAF	I-B	✓	✓	✓	✓
PD-L1 (1)		IHC 100%	IHC 100%	IHC 100%	IHC 100%
MET exon 14 skip	I-B	✓	✓	✓	✓
KRAS	II-B	✓	✓	✓	✓
RET	I-C	✓	✓	✓	✓
NTRK	I-C	✓	✓	✓	✓
ERBB2 Mutazioni	II-B	✓	✓	✓	✓
MET Amplificazioni		✓	✓	✓	✓
ERBB2 Amplificazioni		---	---	---	---
ERBB2 Espressione (1)		IHC (solo Trials)	---	IHC (solo Trials)	---
FGFR 1-2-3		✓	---	✓	---
ALTRE MUTAZIONI		✓	---	✓	---
ULTERIORI MUTAZIONI		✓	---	✓	---
MSI		---	---	---	---
HRD		---	---	---	---
TMB		---	---	---	---

		OSP 1		OSP 2	
		288 Pz	486 Pz	288 Pz	486 Pz
		Profilazione genomica NSCLC Estesa-CGP NGS			
EGFR	I-A	✓	✓	✓	✓
ALK	I-A	✓	✓	✓	✓
ROS1	I-B	✓	✓	✓	✓
BRAF	I-B	✓	✓	✓	✓
PD-L1 (1)		IHC 100%	IHC 100%	IHC 100%	IHC 100%
MET exon 14 skip	I-B	✓	✓	✓	✓
KRAS	II-B	✓	✓	✓	✓
RET	I-C	✓	✓	✓	✓
NTRK	I-C	✓	✓	✓	✓
ERBB2 Mutazioni	II-B	✓	✓	✓	✓
MET Amplificazioni		✓	✓	✓	✓
ERBB2 Amplificazioni		✓	---	✓	---
ERBB2 Espressione (1)		IHC 100%	---	IHC 100%	---
FGFR 1-2-3		✓	---	✓	---
ALTRE MUTAZIONI		✓	---	✓	---
ULTERIORI MUTAZIONI		✓	---	✓	---
MSI		✓	✓	✓	✓
HRD		✓	---	✓	---
TMB		✓	✓	✓	✓

Totale COSTI con Overheads (2)	euro	euro	euro
	1.696	1.866	1.781
Profilazione genomica NSCLC 1a linea trattamento Metodiche STANDARD			
	OSP 1	OSP 2	MEDIA

euro	euro	euro	Totale COSTI con Overheads (2)
1.125	1.166	1.146	
Profilazione genomica NSCLC 1a linea trattamento NGS (pannello 52 geni + pannello fusioni)			
OSP 1	OSP 2	MEDIA	

euro	euro	euro	Totale COSTI con Overheads (2)
1.680	2.046	1.863	
Profilazione genomica NSCLC Estesa - CGP NGS (pannello 300 geni-TMB)			
OSP 1	OSP 2	MEDIA	

✓ =100%

**Biomarcatori RACCOMANDATI per NSCLC secondo
LG POLMONE AIOM 2020³ e Raccomandazioni NGS ESMO 2020⁴
e TERAPIE CON INDICAZIONI RIMBORSATE**

**Biomarcatori CONSIGLIATI per NSCLC secondo
LG POLMONE AIOM 2020³ e Raccomandazioni NGS ESMO 2020⁴
e TERAPIE con MODALITÀ DIVERSE DI ACCESSO:
"uso compassionevole" D.M. 7 settembre 2017
(modalità uso terapeutico di medicinale sottoposto a
sperimentazione clinica oppure uso terapeutico nominale)**

**Alterazioni INDICATE da valutare per NSCLC secondo
LG POLMONE AIOM 2020³ e Raccomandazioni NGS ESMO 2020⁴
+ ALTRE alterazioni (descrizione in tabella 1)
e TERAPIE con FARMACI DISPONIBILI IN TRIALS CLINICI**

**ULTERIORI ALTERAZIONI, MSI, HRD e TMB
(descrizione in tabella 1)**

ESCAT-ESMO⁸: Classificazione alterazioni molecolari a seconda della rilevanza come biomarcatori

(1) PD-L1 e ERBB2 Espressione: non valutabili con test NGS, i costi relativi alle valutazioni effettuate con immunocitochimica (metodica STD) sono compresi nei Percorsi NGS.
IHC (solo Trials) percorso 1, l'alterazione ERBB2 Espressione viene analizzata solo nei pazienti all'interno dei Trials Clinici.

(2) Totale COSTI Percorso Testing con Overheads: questa voce comprende, oltre ai costi specifici per eseguire i test – (i) i costi del personale per il tempo dedicato; (ii) i materiali di consumo utilizzati; (iii) l'acquisto e manutenzione dei macchinari necessari – anche una stima dei costi di struttura (overheads). Per tale stima si è fatto riferimento alla letteratura scientifica¹⁴ che prevede l'incremento del 20% dei costi direttamente attribuibili all'attività diagnostica, non essendo disponibili dati specifici dei centri e non essendovi un dato italiano validato, a causa, tra gli altri aspetti, della variabilità dei sistemi di contabilità analitica.

Tabella 3

Per la profilazione genomica estesa del NSCLC mediante NGS (con pannello 300 geni-TMB) – che consente di valutare/studiare centinaia di alterazioni geniche in una singola analisi, alcune delle quali con implicazioni terapeutiche disponibili nei prossimi anni, e di fornire dati anche sul carico mutazionale del tumore – si è riscontrato un **costo medio compreso overheads pari a € 1.863**.

5. CONCLUSIONI

- La profilazione genica – con la progressiva diffusione dei test NGS – unitamente allo sviluppo di terapie a bersaglio molecolare, rappresenta un fenomeno rilevante nello sviluppo della medicina di precisione e nella cura dei pazienti oncologici.
- **L'analisi di confronto tra metodiche standard e NGS per la profilazione genomica del NSCLC ha evidenziato che l'impiego del sequenziamento genico di nuova generazione è:**
 - ✓ **Consigliabile dal punto di vista clinico** rispetto all'utilizzo di STD, data la limitata disponibilità di campioni tissutali per l'esecuzione di diversi test di patologia molecolare predittiva e la possibilità di analizzare simultaneamente più alterazioni (LG Polmone AIOM³ e Raccomandazioni NGS ESMO⁴).
 - ✓ **Vantaggioso dal punto di vista economico** in quanto il pannello NGS (da 52 geni più pannello fusioni) per la profilazione in 1a linea di trattamento genera un'importante riduzione dei costi per paziente testato rispetto alle metodiche STD; mentre il pannello NGS per la profilazione estesa (pannello 300 geni-TMB) mostra un incremento di costo gestibile.
- Il costo compreso overheads per la profilazione estesa del NSCLC con NGS pari a € 1.863 è relativo a uno scenario prossimo venturo che, permettendo di testare 300 alterazioni geniche, non necessiterà di ulteriori aggiustamenti nel breve/medio periodo, in riferimento al fatto che trattasi di tecnologia in continuo sviluppo con ampliamento progressivo delle mutazioni testate ad invarianza di costo.
- Inoltre il costo compreso overheads per la profilazione estesa NSCLC con NGS è allineato alla tariffa prevista dalla Regione Lombardia (con DGR X/2512 del 17/10/2014) per la prestazione "Analisi di sequenza genica mediante NGS e tecniche assimilabili", pari a € 2.072,74.
- Si ricorda, con riferimento al rapporto tra costi e tariffe, che le tariffe: (i) possono riflettere/essere proxy dei costi di produzione; (ii) possono essere fissate con l'obiettivo di incentivare/disincentivare le relative attività (e quindi non essere totalmente allineate con i costi di produzione); (iii) rappresentano un finanziamento soprattutto per il privato accreditato (il pubblico viene comunque finanziato a costi di produzione).

Infine, il Gruppo di Lavoro auspica che, in riferimento ai nuovi trattamenti in studio correlati alla profilazione genomica, vengano opportunamente valorizzate alcune valutazioni già condivise con interlocutori pubblici del SSN e pubblicate in documenti dal Gruppo di Lavoro stesso, in particolare:

- ✓ nelle valutazioni di Innovatività AIFA si tenga conto delle specificità di alcune tipologie di studio (basket e umbrella trials) e di disegni sperimentali (adaptive design), come indicato nel documento "Valutazione Multidimensionale dell'Innovatività: peculiarità interpretative";¹⁵
- ✓ per le "sottopopolazioni molecolari" (sottogruppi individuati a volume limitato in ambito di patologie neoplastiche a più ampio volume) con tassi di prevalenza assimilabili alle malattie rare, in presenza di un elevato bisogno terapeutico e di forti indicazioni di un beneficio terapeutico aggiunto, sia possibile attribuire l'innovatività anche con una qualità delle prove di livello bassa, come indicato nel documento "Schema per la preparazione del dossier per la richiesta di innovatività dei farmaci".¹⁶

BIBLIOGRAFIA

1. Normanno N, Pinto C, et al. "La profilazione genetica dei tumori". Il Pensiero Scientifico Editore. 2019
2. Documento Workshop ISS FICOG "Test molecolari e Terapie target in Oncologia" - 2020 <https://www.ficog.org/it> (Ultimo accesso: 20 aprile 2021)
3. Linee Guida "Neoplasie del polmone" AIOM 2020 https://www.aiom.it/wp-content/uploads/2020/10/2020_LG_AIOM_Polmone.pdf (Ultimo accesso: 20 aprile 2021)
4. Mosele F, Remon J, et al. 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.* 2020 Nov;31(11):1491-1505 <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.07.014> (Ultimo accesso: 20 aprile 2021)
5. Staaf J, Jönsson G, et al. Relation between smoking history and gene expression profiles in lung adenocarcinomas. *BMC Med Genomics.* 2012; 5:22. <https://bmcmmedgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1755-8794-5-22> (Ultimo accesso: 20 aprile 2021)
6. Shames DS, Wistuba II. The evolving genomic classification of lung cancer. *J Pathol.* 2014; 232:121-133. <https://doi.org/10.1002/path.4275> (Ultimo accesso: 20 aprile 2021)
7. "I numeri del cancro in Italia, 2020" AIOM-AIRTUM <https://www.registri-tumori.it/cms/pubblicazioni/i-numeri-del-cancro-italia-2020> (Ultimo accesso: 20 aprile 2021)
8. Mateo J, Chakravarty D, et al. A framework to rank genomic alterations as targets for cancer precision medicine: the ESMO Scale for Clinical Actionability of Molecular Targets (ESCAT). *Ann Oncol.* 2018; 29: 1895-2002. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy263> (Ultimo accesso: 20 aprile 2021)
9. Aggarwal C, Rodriguez Abreu D, et al. Prevalence of PD-L1 expression in patients with non-small cell lung cancer screened for enrollment in KEYNOTE-001, -010, and -024. *Annals of Oncology* 27 (Supplement 6): vi359–vi378, 2016. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw378.14> (Ultimo accesso: 20 aprile 2021)
10. Pruneri G, De Braud F, et al. Next-Generation Sequencing in Clinical Practice: Is It a Cost-Saving Alternative to a Single-Gene Testing Approach? *Pharmacoeconomics Open.* <https://doi.org/10.1007/s41669-020-00249-0> (Ultimo accesso: 20 aprile 2021)
11. Jommi C, Martini N. "Le evidenze economiche sui test NGS ed il ruolo di tali evidenze nelle scelte di copertura pubblica e di make or buy" in "Il nuovo modello mutazionale in oncologia". Il Pensiero Scientifico Editore. <https://oncoinfo.it/wp-content/uploads/2019/04/concept-paper-italiano.pdf> (Ultimo accesso: 20 aprile 2021)
12. Fahr P, Buchanan J, et al. A Review of Health Economic Studies Comparing Traditional and Massively Parallel Sequencing Diagnostic Pathways for Suspected Genetic Disorders. *Pharmacoeconomics* 2020; 38:143-158. <https://link.springer.com/article/10.1007/s40273-019-00856-8> (Ultimo accesso: 20 aprile 2021)
13. Schwarze K, Buchanan J, et al. Are whole-exome and whole-genome sequencing approaches cost-effective? A systematic review of the literature. *Genet Med* 2018. 20(10):1122-1130. <https://www.nature.com/articles/gim2017247> (Ultimo accesso: 20 aprile 2021)
14. Schwarze K, Buchanan J, et al. The complete costs of genome sequencing: a microcosting study in cancer and rare diseases from a single center in the United Kingdom. *Genet Med* 2020. 22(1):85-94. <https://www.nature.com/articles/s41436-019-0618-7> (Ultimo accesso: 20 aprile 2021)
15. Pappagallo G, Pinto C, et al. "Valutazione Multidimensionale dell'Innovatività: peculiarità interpretative" *Economia & Politica del Farmaco*, 2020 1: 1–5 e Sanità24 (02-03-2020). http://www.economiasanitaria.it/_primopiano/A87.asp (Ultimo accesso: 20 aprile 2021).
16. Pinto C, et al. "Schema per la preparazione del dossier per la richiesta di innovatività dei farmaci" *Economia & Politica del Farmaco*, 2018 2: 4–15 e Sanità24 (21-06-2018). http://www.economiasanitaria.it/_primopiano/A88.asp (Ultimo accesso: 20 aprile 2021).

Ringraziamenti. Il Gruppo di Lavoro ringrazia per il loro contributo alla discussione nel corso di incontri:

Alessandra Sinibaldi, Alessia Brigido (Janssen-Cilag)

Carlo De Risi (Amgen)

Guido Didoni, Maurizio Tropea (MSD Italia)

Giovanni Gancitano, Giovanni Giuliani (Roche)

Disclosure: Il presente lavoro, risultato degli incontri del Gruppo di Lavoro multidisciplinare con il coordinamento di Economia Sanitaria srl, è stato presentato in un evento pubblico, supportato da un "unrestricted grant" di Amgen, Janssen-Cilag, MSD Italia e Roche.

Provenienza: non commissionato, non sottoposto a peer-review.

Copyright: © 2021 Economia Sanitaria srl, Monza (Italy)

E-mail: g.ravasio@economiasanitaria.it