



UNIONE EUROPEA
Fondo europeo di sviluppo regionale



REPUBBLICA ITALIANA



REGIONE AUTÒNOMA DE SARDIGNA
REGIONE AUTONOMA DELLA SARDEGNA



SARDEGNA
RICERCHE

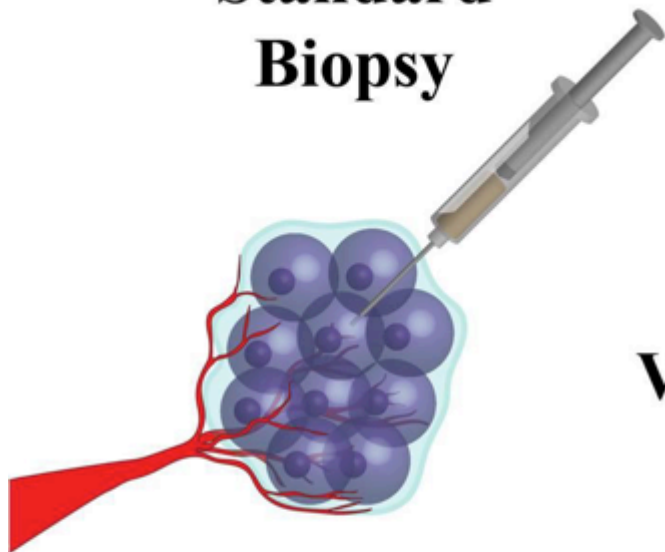


Progetto NIASMIC Non Invasive Analysis of Somatic Mutations in Cancer

1 giugno 2018 - Ospedale Oncologico "A. Businco" Cagliari



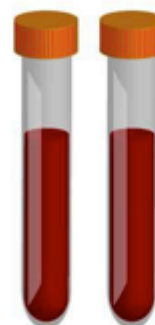
Standard Biopsy



Time-Intensive Procedure
Localized Sampling of Tissue
Not Easily Obtained
Some Pain/Risk
Invasive

VS.

Liquid Biopsy



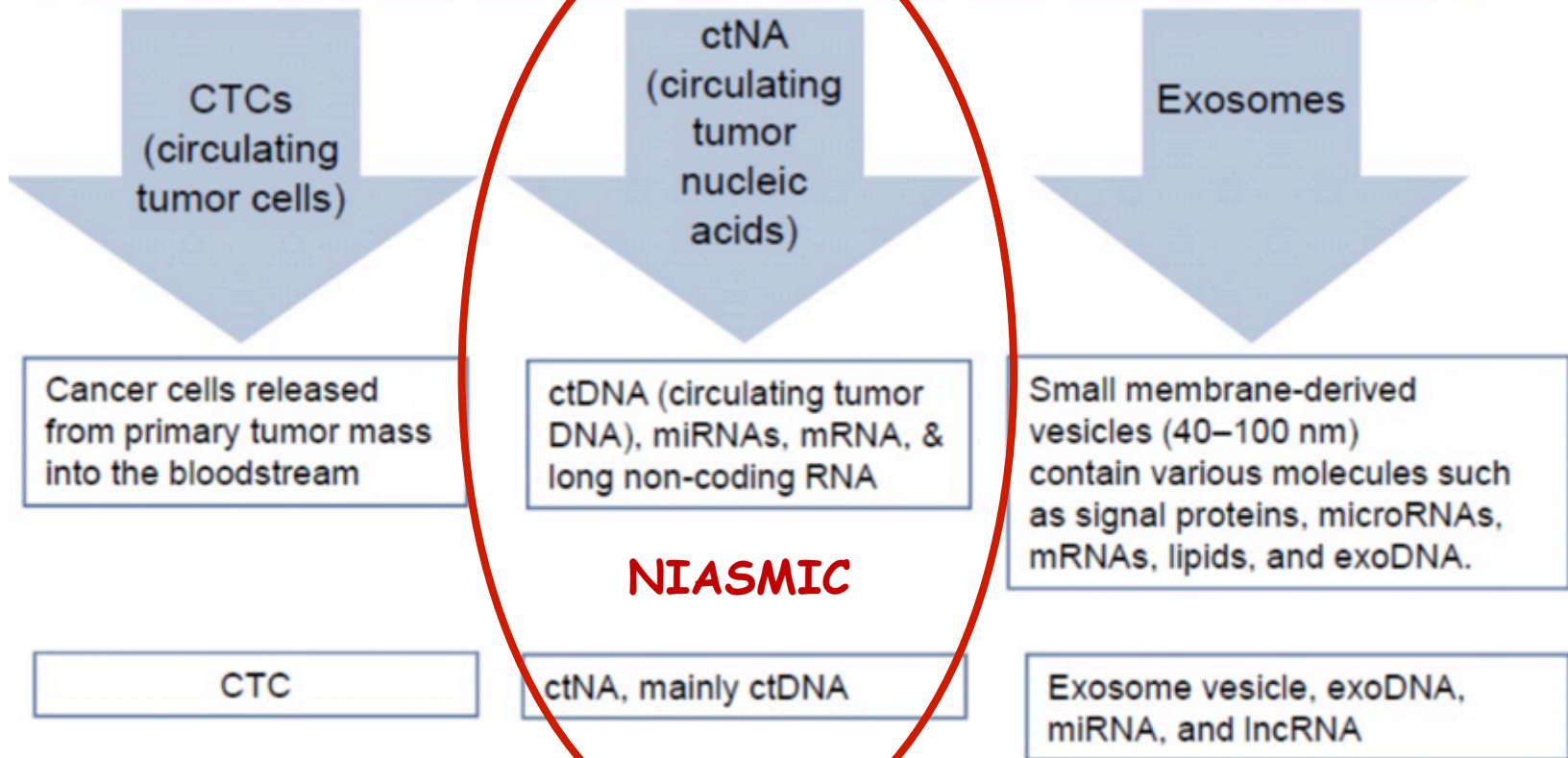
Quick
Comprehensive Tissue Profile
Easily Obtained
Minimal Pain/Risk
Minimally Invasive

Tumor Biopsy	Liquid Biopsy
Invasive and expensive	Non invasive and less expensive
Specific to localized tumor site	Less dependent on original tumor site since tumor from both primary and metastatic sites release DNA into the bloodstream
Assessment of tumor heterogeneity limited to section of biopsy analyzed	Can capture tumor heterogeneity
A limited amount of tissue may be obtained for immunohistochemical and genomic analysis	A few copies of mutant ctDNA are sufficient for analysis
Difficult to biopsy some organs	Easy to collect sample from blood
Not viable if primary tumor has been resected or if the tumor cannot be easily visualized via imaging studies	Allows for serial evaluation in absence of detectable primary tumor or metastases
Serial biopsies are difficult to tolerate	Patient can tolerate serial blood draws for evaluation; may lead to greater compliance
	New tool that can be applied for evaluation of response to therapy and for detection of residual disease
	May allow for evaluation of development of resistance
	May aid in early detection of cancer

Advantages of liquid biopsy over tumor biopsy

- The blood of cancer patients carries circulating tumor cells (CTC), cell-free tumor DNA (ctDNA) and Exosomes that originate from either the primary tumor or from metastatic lesions and can be used as biomarkers
- CTC and ctDNA are easily biopsied from patients with minimal invasiveness (“liquid biopsy”) and can be used for diagnosis, prognosis, recurrence-risk prediction, or can be biopsied at regular intervals to dynamically monitor disease progression, drug response and to tailor cancer care

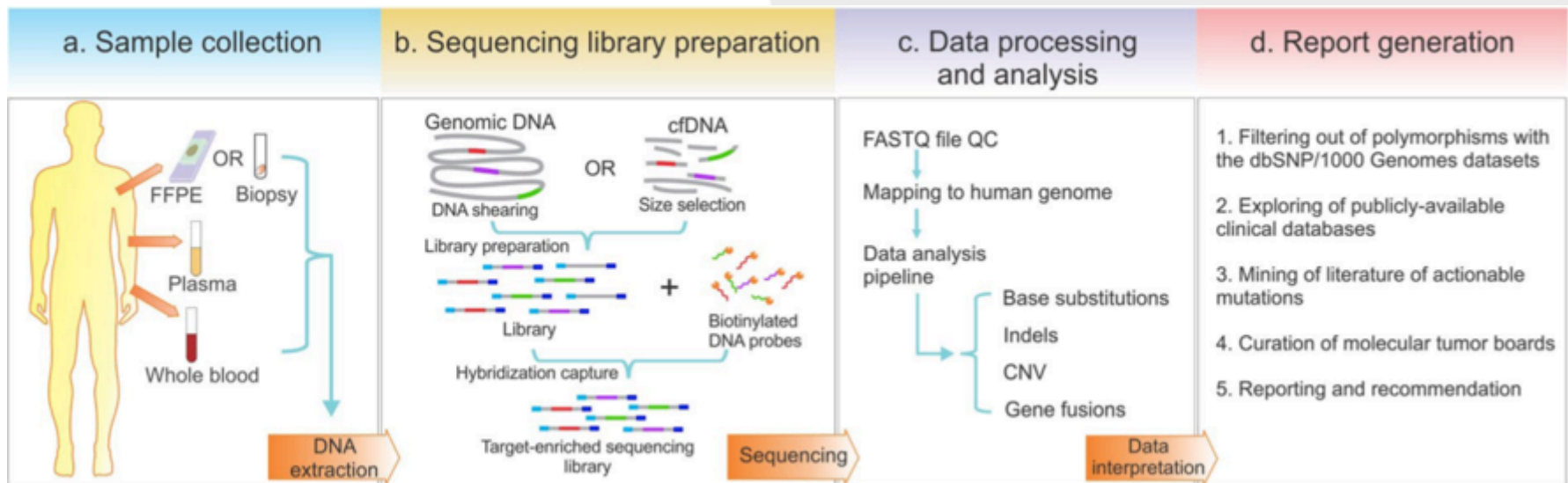
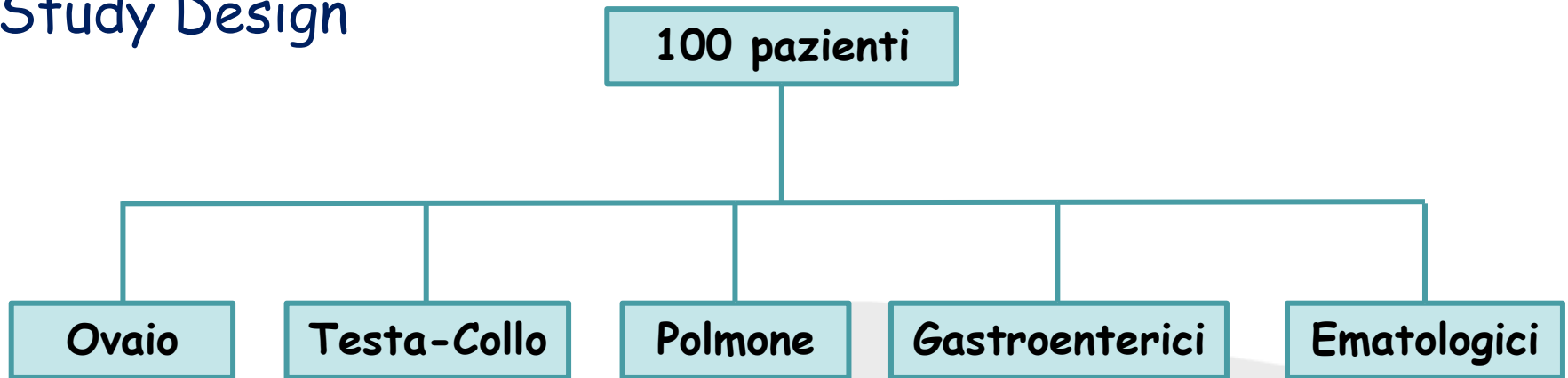
Liquid Biopsies



NIASMIC

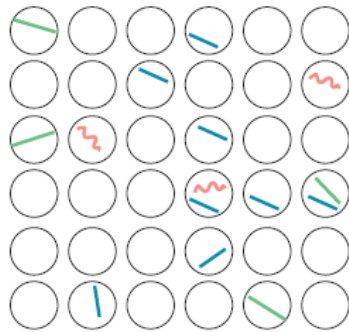
Samples: blood, serum/plasma, urine, CSF, saliva

Study Design

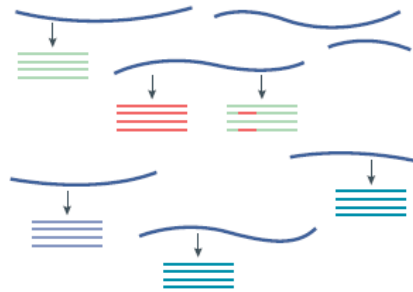


a

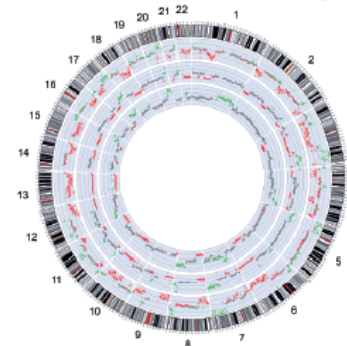
Increasing genomic coverage (and cost) →



Single-locus assays

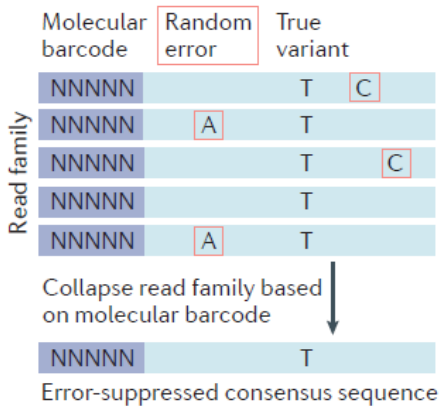


Targeted sequencing

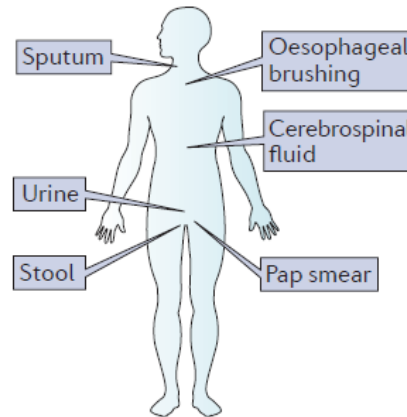


Whole-genome sequencing

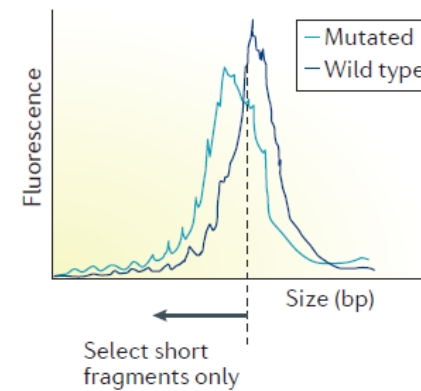
b Reducing background errors



c Proximal sampling



d ctDNA enrichment via size selection



Study Design

Per ogni paziente verranno sequenziati i seguenti campioni:

- DNA estratto da cellule nucleate del sangue per conoscere il genotipo germinale (coverage > 50X)
- DNA estratto da FFPE o da biopsia crioconservata per la comparazione e la validazione dei dati ottenuti da biopsia liquida (coverage > 100X)
- cfDNA purificato da plasma (1° step coverage > 300X, 2° step coverage > 500)

Study Design

1° Step - Studio pilota

Un mini pannello genetico verrà disegnato sulla base delle richieste dei clinici e dei dati presenti in letteratura per le forme di neoplasia oggetto dello studio e comprenderà:

- Tumor Suppressor Genes
- Protooncogeni
- Regioni genomiche soggette a riarrangiamento
- Geni coinvolti nella risposta ai farmaci (farmacogenomica)

Study Design

2° Step - Pannello completo

Tutti i geni e le regioni genomiche che dalla letteratura e i database hanno evidenziato un significativo coinvolgimento nell'insorgenza, la progressione e la risposta alle terapie delle neoplasie in generale costituiranno il pannello genetico completo

N tsg

N protoonco

N regioni

N farmacogenetica

Workflow

- Prelievo, conservazione e trasporto del campione di sangue
- Separazione del plasma
- Estrazione di DNA da plasma, FFPE, PBMC
- Preparazione delle librerie e cattura delle regioni target
- Sequenziamento
- Analisi bioinformatica
- Comparazione, validazione e interpretazione delle varianti
- Report

Protocollo NGS

- Preparazione delle librerie con sistema UMI
- Cattura delle regioni target
- Sequenziamento su HiSeq3000 con coverage > 500X
- Analisi bioinformatica a 300X (1°step in silico)
- Identificazione delle varianti, validazione e analisi della concordanza con FFPE
- Analisi bioinformatica a 500X (2°step in silico)
- Identificazione delle varianti, validazione e analisi della concordanza con FFPE

Prospettive future

**Produzione di un unico protocollo di analisi per tutti i tipi di neoplasie
(Pannello completo)**

Vantaggi:

- Riduce la complessità nella gestione di campioni provenienti da diversi reparti
➔ centralizzazione delle analisi
- Semplifica il processo di trasferimento tecnologico
- Agevola i processi di automazione
- Diminuisce il costo dei reagenti di preparazione delle librerie
- Favorisce la ricerca con indagini a più ampio spettro

Svantaggi:

- Aumenta il consumo dei reagenti di sequenziamento

Grazie per l'attenzione e

buona collaborazione a tutti noi!!!

Roberto