



**SARDEGNA
RICERCHE**

Sardegna FESR 2014/2020 - ASSE PRIORITARIO I

“RICERCA SCIENTIFICA, SVILUPPO TECNOLOGICO E INNOVAZIONE”

Azione 1.1.4 Sostegno alle attività collaborative di R&S per lo sviluppo di nuove tecnologie sostenibili, di nuovi prodotti e servizi

**PROGETTO CLUSTER TOP DOWN
“NIASMIC - Not Invasive Analysis of Somatic
Mutations In Cancer”
RAPPORTO TECNICO
ANALISI HTA (Fase finale)**



**SARDEGNA
RICERCHE**

Indice

Sommario	3
Introduzione	3
Metodi	3
Risultati	3
Conclusioni	4
Introduzione generale	5
Razionale scientifico uso pannelli	5
Applicazione al progetto NIASMIC	6
Stato dell'arte	6
Sviluppo del pannello	8
Analisi dei costi	11
Stima dei costi per il progetto NIASMIC - pannelli	11
Conclusioni	13
Bibliografia	14

Sommario

Introduzione

I tumori solidi e le patologie oncoematologiche di tipo linfoproliferativo sono una delle principali cause di morbidità e mortalità in tutto il mondo, primariamente a causa del fallimento della precoce individuazione della malattia in fase iniziale, con un conseguente impatto sulla efficacia del trattamento. Il progetto NIASMIC – Non Invasive Analysis of Somatic Mutations in Cancer – nasce con l'intento di abbinare la tecnologia di sequenziamento NGS ad un trend sempre più diffuso e rappresentato dalla sostituzione della biopsia solida con quella liquida a scopi diagnostici, con i vantaggi che quest'ultima comporta. Più nel dettaglio, la biopsia liquida rappresenta una fonte di diversi analiti e biomarcatori che possono essere utilizzati in campo diagnostico. In questo contesto, il progetto NIASMIC prevede il sequenziamento di DNA circolante tumorale (ctDNA) a partire dalla frazione plasmatica.

L'obiettivo è di valutare con i principi dell'Health Technology Assessment (HTA) i vantaggi e i limiti del progetto NIASMIC rispetto al gold standard per il sequenziamento in diagnostica in ambito sanitario pubblico analizzando la qualità diagnostica, le caratteristiche tecniche, la sicurezza, il rapporto costo-efficacia e l'appropriatezza, considerando le ricadute cliniche, etiche e tecniche.

Metodi

I dati sono stati raccolti principalmente tramite ricerca bibliografica (PubMed), indagini di mercato, dati del Sistema Sanitario Nazionale e analisi dei costi.

Risultati

Le metodiche di sequenziamento NGS, seppure all'avanguardia, non risultano diffuse in Italia nel campo diagnostico. La metodologia Sanger è ancora la più utilizzata, nonostante sia più cara (considerando la quantità di dati prodotti) e meno efficiente se paragonata alle metodologie NGS. L'utilizzo del ctDNA a scopi diagnostici rientra in un trend osservato nella comunità finanziaria. Il potenziale di mercato del settore è stato valutato dalla J.P. Morgan Healthcare Conference nel 2016 e stimato per oltre 20 miliardi di dollari, considerando l'impatto che potrebbe avere sulla personalizzazione terapeutica, il monitoraggio dei suoi effetti, la valutazione dei rischi in fase di prognosi e lo screening.



**SARDEGNA
RICERCHE**

Conclusioni

L'implementazione del progetto NIASMIC nella pratica diagnostica, con l'utilizzo della tecnologia NGS per il sequenziamento di ctDNA da biopsia liquida, risulta cost-effective per il SSN e per il paziente, time-saving per il SSN e per il paziente, migliorerebbe il percorso clinico e diagnostico del paziente e, in un secondo momento, faciliterebbe anche il follow-up del paziente con relativo monitoraggio dell'efficacia terapeutica, specialmente se accoppiato ad una strategia di Targeted Sequencing (TS).



Introduzione generale

Il seguente HTA è focalizzato sulla costruzione di pannelli genici per il progetto NIASMIC e sulla valutazione quantitativa dei costi associati all'adozione della tecnologia di Targeted NGS su DNA tumorale libero circolante (circulating tumor DNA – ctDNA) estratto da biopsia liquida di pazienti oncologici e confrontato con i rispettivi DNA estratti dal tessuto tumorale primario fresco o crioconservato per uso diagnostico e predittivo nella pratica clinica.

Gli aspetti presi in considerazione sono il contesto scientifico e lo stato dell'arte, la validità analitica, l'utilità clinica e i vantaggi apportati dallo sviluppo del progetto e i costi.

La valutazione dei benefici, degli svantaggi dell'applicazione dei pannelli genici per il sequenziamento e per eventuali raccomandazioni sono state eseguite in un'ottica di comparazione con un approccio Whole Genome Sequencing (WGS). A tal fine si è proceduto con l'analisi delle diverse dimensioni che riguardano la tecnologia, quali il contesto di utilizzo, la descrizione della tecnologia, nonché gli aspetti economici ed organizzativi.

Razionale scientifico uso pannelli

Paragonato al WGS o al Whole Exome Sequencing (WES), il Targeted Sequencing (TS) è un approccio potente che bilancia un'accurata identificazione ad alta sensibilità dei geni target con i limiti dei costi e della mole dei dati generati. I pannelli genici per il TS spesso permettono di analizzare specifiche mutazioni nei campioni di interesse, includendo una selezione standard oppure personalizzata di geni o di più regioni dello stesso gene con conosciuta o sospetta associazione con la patologia in esame. Una delle principali caratteristiche del TS è l'elevata profondità di sequenziamento che si utilizza per effettuare il profiling dei campioni clinici e ciò lo rende un approccio altamente desiderabile per i campioni conservati in paraffina o per i campioni di ctDNA in cui la qualità o il contenuto di DNA tumorale sono bassi. Inoltre, l'elevata profondità di sequenziamento permette anche di riscontrare mutazioni presenti solamente in una piccola frazione delle cellule tumorali, ad un livello subclonale, oppure di rilevare il minimal residual disease¹⁻³. Queste proprietà, non solo rendono il TS superiore alle tecnologie non-NGS come il sequenziamento Sanger (già analizzato nel precedente HTA) o come la digital-PCR, ma anche più efficiente del WGS e del WES in testing su larga scala o in trial clinici. Il TS è adoperato, per esempio, in trial clinici sul cancro per stratificare i pazienti in sottogruppi sulla base dello stato mutazionale di geni chiave⁴⁻¹⁰.

Da un punto di vista tecnico, il TS può essere basato su un arricchimento ad ampliconi, ovvero utilizzando primer specifici per amplificare le regioni di interesse prima della fase di preparazione della libreria per il sequenziamento; oppure basato su cattura, in cui il DNA viene frammentato e le regioni target sono arricchite tramite l'ibridazione di sonde oligonucleotidiche complementari alle regioni di interesse e biotinilate per permetterne la purificazione. Tra le due metodiche, l'arricchimento basato su ampliconi è meno costoso, restituisce un maggior numero di reads on-target e richiede meno materiale di partenza; tuttavia l'arricchimento per sonde garantisce un coverage più uniforme, una specificità elevata e porta alla formazione di meno duplicati di PCR, rendendo questo approccio particolarmente utile in quei casi in cui questi artefatti occorrono più spesso, come nei campioni paraffinati e ctDNA¹¹. L'insieme dei primer o delle sonde disegnati sulle coordinate genomiche di interesse costituiscono il pannello genico. A differenza dei pannelli



**SARDEGNA
RICERCHE**

utilizzati nel WES, le coordinate genomiche non sono ristrette alle regioni codificanti dei geni ma possono includere anche promotori o breakpoints^{12,13}. Sono già presenti in commercio primer, sonde e pannelli di geni disegnati a scopi di ricerca o clinici, già disegnati, testati e validati, ma esiste anche la possibilità di disegnare dei pannelli custom includendo le coordinate di interesse e disegnando nuove sonde.

Applicazione al progetto NIASMIC

Il progetto NIASMIC si propone di sviluppare un protocollo di analisi del profilo genetico del ctDNA estratto da biopsia liquida di pazienti oncologici ed ematologici mediante l'applicazione del TS su un pannello di geni. Il pannello, studiato in collaborazione con i reparti di oncologia degli ospedali coinvolti, sarà comprensivo delle regioni genomiche di interesse clinico per un ampio spettro di tumori.

La combinazione della biopsia liquida con la tecnologia NGS avrà un impatto diretto sullo sviluppo dei test diagnostici disponibili e sulla possibilità di fornire un quadro completo nella diagnosi e gestione della patologia poiché consentirà di sviluppare dei “kit” non invasivi per lo screening, la diagnosi, il monitoraggio della risposta al trattamento e dell’andamento della malattia

La messa in opera di un sistema di indagini genetiche estremamente approfondite a partire dalla biopsia liquida, darà notevoli vantaggi sia per i pazienti, che non saranno sottoposti a biopsie invasive e riceveranno diagnosi precoci e terapie personalizzate, che per gli enti sanitari, che svolgeranno a minori costi analisi più utili alla corretta gestione dei pazienti e alle scelte terapeutiche più efficaci, che per le aziende che potranno sviluppare prodotti innovativi per lo screening, la diagnosi e il follow-up in oncologia, un settore in forte espansione secondo recenti analisi del mercato delle biotecnologie per la salute.

Stato dell’arte

Numerosi studi clinici nella letteratura si avvalgono del TS a partire da materiale genomico per ricerca su campioni clinici, alcuni dei quali sono riportati in Tabella 1.



**SARDEGNA
RICERCHE**

Tabella 1 Esempi di studi clinici che si avvalgono di TS. Tabella adattata da ¹¹

PATOLOGIA	# GENI	PROFONDITÀ DI SEQUENZIAMENTO	PIATTAFORMA	CATTURA	REF
LEUCEMIA MIELOIDE ACUTA	51	1280x	Agilent Haloplex	Amplificazioni	14
	111	-	Roche NimbleGen Agilent SureSelect	Sonde	15
TUMORE AL SENO	Variabili	-	Roche NimbleGen Illumina TruSeq Amplicon	Sonde Amplificazioni	16
	122	300x	Illumina TruSeq Amplicon	Amplificazioni	17
LINFOMA FOLLICOLARE	28	840x	Fluidigm Access Array	Amplificazioni	18
	74	-	Agilent SureSelect	Sonde	10
TUMORE AL PANCREAS	25	8000x	Agilent Haloplex	Amplificazioni	19
	116	754x	Agilent SureSelect	Sonde	20
MELANOMA	74	500x	Agilent SureDesign	Sonde	21



**SARDEGNA
RICERCHE**

Sviluppo del pannello

Per il progetto NIASMIC è stato disegnato un pannello di geni custom attraverso revisione della letteratura scientifica e incrociando i dati pubblicati su database di mutazioni tumorali, quali TCGA, CbioPortal, e Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC)^{22–26}. Per ciascuno dei tumori in esame (neuroblastoma, ginecologici, del distretto testa-collo, del tratto biliare, epatici, pancreatici, del colon e del retto, polmonari) sono stati selezionati i geni mutati più frequentemente. Più nel dettaglio, per ciascun gene in esame è stata valutata la presenza di difetti a livello di sequenza (mutazioni puntiformi), a livello genico (geni di fusione), a livello genomico (traslocazione, inversione, duplicazione) e alterazioni istologiche (pattern di espressione); per ciascun gene e per ogni tipologia di alterazione è presente un valore percentuale corrispondente al numero di biopsie positive per il gene in esame (sul totale delle biopsie comprendenti il gene stesso). Infine, per includere i geni significativamente più coinvolti nelle patologie in esame, è stato attribuito un punteggio considerando in quanti dei distretti esaminati il gene è presente in >1% e in <1% dei campioni, se il gene presenta alterazioni in più distretti e se presenta più alterazioni nello stesso distretto. Questa lista di geni è stata poi integrata con una lista di geni ritenuti svolgere un ruolo nella tumorigenesi (dati provenienti dalla letteratura e dagli oncologi partner clinici del progetto NIASMIC), per un totale di 378 geni. Va segnalato che in corso d'opera sono stati modificati alcuni parametri. Le analisi sono state eseguite con le modalità descritte in dettaglio nel rapporto (Descrizione del protocollo sperimentale) prendendo in considerazione la necessità di ottimizzare l'utilizzo dei reagenti di sequenziamento. Inoltre, il pannello genico pensato in origine è stato rimodulato, sia per quanto riguarda il suo contenuto, rivisto dai partner clinici, sia perché il disegno dettagliato dal punto di vista molecolare è stato eseguito dall'azienda fornitrice delle sonde, con accorgimenti specifici dei quali non si conoscono i dettagli.

Tabella 2 Geni selezionati per il progetto NIASMIC

ABL1	CIC	FGFR3	MDM2	PGR	SETD2
ABL2	CLTCL1	FGFR4	MECOM	PHOX2B	SF3B1
ACVR2A	CREBBP	FH	MED12	PIK3C2B	SH2D1A
AFF3	CSF1R	FHIT	MEN1	PIK3C2G	SLX4



**SARDEGNA
RICERCHE**

AIP	CTCF	FLCN	MET	PIK3C3	SMAD2
AKT1	CTHRC1	FLT3	MGA	PIK3CA	SMAD3
AKT2	CTNNA1	FLT4	MITF	PIK3CB	SMAD4
AKT3	CTNNB1	FOXP1	MLH1	PIK3CD	SMARCA2
ALK	CUX1	GATA1	MLH3	PIK3CG	SMARCA4
ANKRD11	CXCR4	GATA2	MPL	PIK3R1	SMARCB1
ANTXR1	CYLD	GATA3	MRE11A	PMS1	SMARCE1
APC	DAXX	GATA4	MSH2	PMS2	SMO
AR	DDB2	GATA6	MSH3	POLD1	SMYD3
ARAF	DDR2	GNA11	MSH6	POLE	SND1
ARID1A	DDX3X	GNAQ	MSR1	POLH	SOS1
ARID1B	DDX5	GNAS	MTAP	POLQ	SOX9
ARID2	DICER1	GPC3	MTOR	POT1	SPEN
ARID4B	DNMT1	GRIN2A	MUC1	PPM1D	SPINK1
ASCC1	DNMT3A	GRM3	MUTYH	PRDM16	SPRED1
ASXL1	DNMT3B	HDAC1	MYC	PREX2	SRC
ATM	EBF1	HGF	MYCN	PRF1	STAG1
ATP2B3	EGFR	HLA-A	MYH11	PRKAR1A	STAG2
ATR	EIF4A2	HNF1A	MYH8	PRKDC	STAT1
ATRX	ELAC2	HNF1B	MYH9	PRSS1	STAT2
AURKA	ELF4	HOXB13	MYO5A	PTCH1	STAT3



**SARDEGNA
RICERCHE**

AXIN1	EML4	HRAS	NBN	PTCH2	STAT4
AXIN2	EMSY	IDH1	NCOA2	PTEN	STAT6
AXL	EP300	IDH2	NCOA3	PTPN11	STK11
B2M	EP400	IGF1	NCOA4	PTPRB	SUFU
BAP1	EPCAM	IGF1R	NCOR1	PTPRC	TCF7L2
BARD1	ERBB2	IGF2	NCOR2	PTPRD	TERT
BCL2	ERBB3	INPPL1	NDRG1	PTPRT	TET1
BCL3	ERBB4	IRF4	NF1	RAC1	TET2
BCL6	ERC1	JAK1	NF2	RAD21	TET3
BCL9	ERCC1	JAK2	NFE2L2	RAD50	TGFBR1
BCOR	ERCC2	JAK3	NOTCH1	RAD51B	TGFBR2
BLM	ERCC3	JARID2	NOTCH2	RAD51C	TMEM127
BMPR1A	ERCC4	KDM5A	NOTCH3	RAD51D	TOP1
BRAF	ERCC5	KDM5C	NOTCH4	RARA	TP53
BRCA1	ESR1	KDM6A	NPM1	RB1	TP63
BRCA2	ETV6	KDR	NRAS	RBM10	TPM3
BRIP1	EXT1	KEAP1	NRG1	RECQL4	TPR
BUB1	EXT2	KIT	NSD1	RELN	TRRAP
BUB1B	EZH1	KLLN	NSD3	RET	TSC1
CACNA1D	EZH2	KMT2A	NTRK1	RHBDF2	TSC2
CAMTA1	FANCA	KMT2B	NTRK3	RICTOR	UBR5



**SARDEGNA
RICERCHE**

CARD11	FANCB	KMT2C	NUMA1	RNASEL	VAV1
CASP8	FANCC	KMT2D	NUP214	RNF168	VAV2
CBL	FANCD2	KRAS	PALB2	RNF213	VEGFA
CCND1	FANCE	LIFR	PALLD	RNF43	VHL
CDC73	FANCF	LIG4	PARP1	ROS1	WAS
CDH1	FANCG	LMNA	PARP2	RPTOR	WRN
CDK12	FANCI	LPP	PAX3	RSPO1	WT1
CDK4	FANCL	LRP1B	PAX7	RUNX1	XPA
CDK6	FANCM	LRP5	PBRM1	RUNX1T1	XPC
CDKN1A	FAT1	MAP2K1	PBX1	SBDS	XPO1
CDKN1B	FAT4	MAP2K2	PC	SDHA	XRCC2
CDKN2A	FBXW7	MAP2K4	PCLO	SDHAF2	XRCC4
CDKN2B	FGF3	MAP3K13	PCM1	SDHB	YAP1
CHD4	FGF4	MAPK1	PDE4DIP	SDHC	ZFH3
CHEK1	FGFR1	MAX	PDGFRA	SDHD	ZNF521
CHEK2	FGFR2	MDC1	PDGFRB	SETBP1	DPYD
SOX2	EPHA2	CCND2	CCND3	TACC3	NTRK2

Analisi dei costi

Stima dei costi per il progetto NIASMIC - pannelli

Per effettuare la stima dei costi relativa al progetto NIASMIC, abbiamo considerato la diagnosi e il follow-up come due fasi differenti del progetto. Nella prima fase, ovvero al momento della diagnosi,



**SARDEGNA
RICERCHE**

sarà necessario effettuare il sequencing del DNA genomico (gDNA), del DNA somatico (sDNA) e, infine, del ctDNA. Nella seconda fase (follow-up) sarà necessario effettuare solamente l'analisi del ctDNA (Tabella 3). Per singolo paziente sono quindi previsti quattro sequenziamenti, utilizzando dei frammenti di 75bp + 75bp: sequencing del gDNA con un coverage di 50x, del sDNA con un coverage di 950x e due sequencing del ctDNA a 2000x. Le quattro reazioni di sequencing prevedono inoltre l'utilizzo di sonde disegnate su un pannello di 378 geni target (vedi Tabella 2) per effettuare la cattura delle sequenze di interesse, ovvero sequenze codificanti principalmente per geni coinvolti nella carcinogenesi, nei processi di metastatizzazione e geni che possono determinare la risposta alla terapia (geni farmacogenomica). Tale pannello ha una grandezza di circa 1.2Mb.

Con queste premesse, il sequenziamento di 1.2Mb target dal ctDNA, del gDNA e del sDNA per un coverage totale di 5000x corrisponde a 6Gb (equivalenti a 40M di clusters). Considerando che una flowcell può contenere 370M di clusters/lane e che allo stato attuale una lane di sequenziamento ha un costo stimato di 1600€, comprensivo di reagenti, è possibile il sequenziamento del ctDNA, del gDNA e del sDNA il materiale di 9 pazienti per lane (40M di clusters * 9 pazienti = 360M di clusters) ad un costo di 180€/paziente. Al costo del sequenziamento vanno però aggiunti i costi dei reagenti precedenti al sequenziamento, rappresentati principalmente dall'estrazione del DNA, dalla library preparation e dalla fase di cattura (Tabella 4).

Tabella 3 Stima dei costi per paziente con applicazione del progetto NIASMIC

	Coverage	Cluster 378 geni	Campioni per lane	Costo per campion e	Costo dei reagenti	Ammortamento	Totale per paziente
ctDNA – T0	2000						
gDNA	500	40M	9	180€	290€	30€	500€
sDNA	950						
ctDNA - FU	2000						

Tabella 4 Costo dei reagenti

Reagenti	Costi
<i>Library prep x4</i>	180
<i>Sonde pannello</i>	60
<i>Blocking oligos</i>	30
<i>Hybrid Washkit</i>	10
<i>Dynabeads</i>	10
Totale	290

Conclusioni

Un importante risultato del presente HTA è dato dalla quantificazione dei costi reali per sequenziamento in diagnostica in Italia con l'utilizzo di un sistema TS. Oggigiorno ci si avvale ancora della tecnologia Sanger per il sequenziamento di blocchi di circa 400bp per volta, ad un costo che per il sequenziamento di un singolo gene nella maggior parte dei casi potrebbe raggiungere addirittura il costo del WES o WGS, con evidenti differenze in termini di risultati e rapidità. Nonostante quello economico sia un aspetto molto importante da tenere in considerazione, è importante menzionare le altre ricadute che l'implementazione delle tecnologie NGS apporterebbe nella pratica clinica avvalendosi nella biopsia liquida, come già menzionato nella precedente valutazione HTA.



**SARDEGNA
RICERCHE**

Da non trascurare il fatto che l'utilizzo di un sistema TS comporti dei vantaggi non indifferenti rispetto al WES o al WGS, tra cui il rilevamento e la quantificazione di varianti rare e a bassa frequenza, un coverage più elevato, una maggior profondità di sequenza e un'analisi bioinformatica facilitata. Se è vero però che il design del pannello e l'acquisto di reagenti addizionali per il TS richieda dei costi accessori, utilizzare TS migliora il bilancio finale dei costi, risparmiando su tempo e risorse e permettendo l'analisi di un maggior numero di campioni simultaneamente. Inoltre, il design di un pannello originale comprendente geni condivisi tra più tipologie tumorali e alterati a più livelli, oncogeni già noti e geni ritenuti svolgere un ruolo nella tumorigenesi, ha come scopo primario l'utilizzabilità per la diagnosi e lo screening in oncologia a partire da un prelievo ematico. A questo seguono altri scopi, non di secondaria importanza, tra cui la possibilità di monitorare nel tempo gli effetti terapeutici in maniera non invasiva e la possibilità di acquisire nuove conoscenze scientifiche, associando geni già noti per essere coinvolti in processi neoplastici in altre tipologie tumorali.

Bibliografia

1. Yates, L. R. et al. Subclonal diversification of primary breast cancer revealed by multiregion sequencing. *Nat. Med.* (2015). doi:10.1038/nm.3886
2. Shin, H. T. et al. Prevalence and detection of low-allele-fraction variants in clinical cancer samples. *Nat. Commun.* (2017). doi:10.1038/s41467-017-01470-y
3. Tawana, K. et al. Disease evolution and outcomes in familial AML with germline CEBPA mutations. *Blood* (2015). doi:10.1182/blood-2015-05-647172
4. Wu, S. et al. Whole-genome sequencing identifies ADGRG6 enhancer mutations and FRS2 duplications as angiogenesis-related drivers in bladder cancer. *Nat. Commun.* (2019). doi:10.1038/s41467-019-08576-5
5. Parry, M. et al. Genetics and prognostication in splenic marginal zone lymphoma: Revelations from deep sequencing. *Clin. Cancer Res.* (2015). doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-2759
6. Xu, Y. et al. Implications of mutational spectrum in myelodysplastic syndromes based on targeted next-generation sequencing. *Oncotarget* (2017). doi:10.18632/oncotarget.19628
7. Xu, F. et al. Whole-exome and targeted sequencing identify ROBO1 and ROBO2 mutations as progression-related drivers in myelodysplastic syndromes. *Nat. Commun.* (2015). doi:10.1038/ncomms9806
8. Li, J. et al. Targeted massively parallel sequencing of a panel of putative breast cancer susceptibility genes in a large cohort of multiple-case breast and ovarian cancer families. *J. Med. Genet.* (2016). doi:10.1136/jmedgenet-2015-103452
9. Oh, B. Y. et al. Intratumor heterogeneity inferred from targeted deep sequencing as a prognostic indicator. *Sci. Rep.* (2019). doi:10.1038/s41598-019-41098-0



**SARDEGNA
RICERCHE**

10. Pastore, A. et al. Integration of gene mutations in risk prognostication for patients receiving first-line immunochemotherapy for follicular lymphoma: A retrospective analysis of a prospective clinical trial and validation in a population-based registry. *Lancet Oncol.* (2015). doi:10.1016/S1470-2045(15)00169-2
11. Bewicke-Copley, F., Arjun Kumar, E., Palladino, G., Korfi, K. & Wang, J. Applications and analysis of targeted genomic sequencing in cancer studies. *Computational and Structural Biotechnology Journal* (2019). doi:10.1016/j.csbj.2019.10.004
12. Zehir, A. et al. Mutational landscape of metastatic cancer revealed from prospective clinical sequencing of 10,000 patients. *Nat. Med.* (2017). doi:10.1038/nm.4333
13. Kim, H. K. et al. Targeted next-generation sequencing at copy-number breakpoints for personalized analysis of rearranged ends in solid tumors. *PLoS One* (2014). doi:10.1371/journal.pone.0100089
14. Ivey, A. et al. Assessment of minimal residual disease in standard-risk AML. *N. Engl. J. Med.* (2016). doi:10.1056/NEJMoa1507471
15. Abelson, S. et al. Prediction of acute myeloid leukaemia risk in healthy individuals. *Nature* (2018). doi:10.1038/s41586-018-0317-6
16. Ellis, M. J. et al. Whole-genome analysis informs breast cancer response to aromatase inhibition. *Nature* (2012). doi:10.1038/nature11143
17. Couch, F. J. et al. Inherited mutations in 17 breast cancer susceptibility genes among a large triple-negative breast cancer cohort unselected for family history of breast cancer. *J. Clin. Oncol.* (2015). doi:10.1200/JCO.2014.57.1414
18. Okosun, J. et al. Integrated genomic analysis identifies recurrent mutations and evolution patterns driving the initiation and progression of follicular lymphoma. *Nat. Genet.* (2014). doi:10.1038/ng.2856
19. Araf, S. et al. Genomic profiling reveals spatial intra-tumor heterogeneity in follicular lymphoma. *Leukemia* (2018). doi:10.1038/s41375-018-0043-y
20. Sausen, M. et al. Clinical implications of genomic alterations in the tumour and circulation of pancreatic cancer patients. *Nat. Commun.* (2015). doi:10.1038/ncomms8686
21. Martincorena, I. et al. High burden and pervasive positive selection of somatic mutations in normal human skin. *Science* (80-.). (2015). doi:10.1126/science.aaa6806
22. Weinstein, J. N. et al. The cancer genome atlas pan-cancer analysis project. *Nature Genetics* (2013). doi:10.1038/ng.2764
23. Forbes, S. A. et al. COSMIC: Somatic cancer genetics at high-resolution. *Nucleic Acids Res.* (2017). doi:10.1093/nar/gkw1121
24. Nikiforova, M. N., Wald, A. I., Roy, S., Durso, M. B. & Nikiforov, Y. E. Targeted next-generation sequencing panel (ThyroSeq) for detection of mutations in thyroid cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* (2013). doi:10.1210/jc.2013-2292
25. Kortüm, K. M. et al. Targeted sequencing using a 47 gene multiple myeloma mutation panel (M3P) in -17p high risk disease. *Br. J. Haematol.* (2015). doi:10.1111/bjh.13171



**SARDEGNA
RICERCHE**

26. Chen, K. et al. Clinical actionability enhanced through deep targeted sequencing of solid tumors. Clin. Chem. (2015). doi:10.1373/clinchem.2014.231100